

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereichs der Medizin der Universität Marburg
(Direktor: Prof. Dr. med. T. Gudermann)

Einfluß des Glycosylierungsmusters auf die Basalaktivität von hTRPC3 und hTRPC6



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich der Medizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt
von
Jens Emmel
aus Hadamar

Marburg, 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
26.02.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. med. Matthias Rothmund
Referent:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
1.Korreferent:	PD Dr. rer. nat. Hans Albert Braun

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	1
1.1 Calcium als intrazellulärer Botenstoff.....	1
1.2 TRP-Kanäle und ihre Entdeckung	3
1.3 Die TRP-Familie und ihre Subfamilien	5
1.4 Die Struktur der TRP-Kanal-Proteine	8
1.5 Die Funktion der TRP-Kanäle	9
1.6 TRP-Kanäle und ihre Aktivierung	10
1.7 TRP-Kanäle und ihre Präsenz.....	12
1.8 TRP-Kanäle und ihre Multimerisierung.....	14
1.9 Glykosylierung und ihre Grundprinzipien	15
1.9.1 Posttranslationale Modifikation der Proteine.....	16
1.9.2 O-Glykosylierung	18
1.9.3 Phosphoglykosylierung	19
1.9.4 N-Glykosylierung.....	19
1.9.5 Vorkommen der verschiedenen Glykosylierungen	20
1.9.6 Zielsetzung der Arbeit.....	21
2. Material und Methoden.....	22
2.1 Materialien	22
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	22
2.1.2 Reagenzien und Enzyme	22
2.1.3 Agonisten und Pharmaka	22
2.2 Elektrophysiologie	23
2.2.1 Herstellung von Patchpipetten und deren Beschichtung.....	25
2.2.2 Badlösungen, Pipettenlösungen.....	27
2.2.3 Offsetpotential.....	28
2.2.4 Liquid Junction Potential	28
2.2.5 Mikromanipulator	29
2.2.6 Referenzelektrode.....	30
2.2.7 Pipettenhalter.....	31
2.2.8 Perfusionssystem.....	32
2.2.9 Messkammer	34

2.2.8	Perfusionssystem.....	35
2.3	Pipettenkapazität	35
2.4	Zellkultur.....	35
2.4.1	Tranfektion.....	36
2.4.2	Messvorbereitungen	37
2.4.3	Sealbildung	37
2.4.4	Ganzzellkonfiguration (Whole-Cell Konfiguration)	38
2.4.5	Einzelkanalconfiguration (Single-Channel Konfiguration)	38
2.5	Statistik	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Kanäle ohne Veränderungen der Glykosylierungsstruktur	41
3.1.1	Stromdichte und Basalaktivität von hTRPC3 sowie hTRPC6.....	41
3.1.2	Aktivierung von hTRPC3 und hTRPC6	44
3.1.3	Stromverlauf von hTRPC3 und hTRPC6	46
3.1.4	Umkehrpotential von hTRPC3 und hTRPC6.....	49
3.1.5	Biophysikalische Eigenschaften von mTRPC7	51
3.2	Kanäle mit Veränderungen der Glykosylierungsstruktur	55
3.2.1	hTRPC6-N561Q.....	55
3.2.2	hTRPC6-N473Q-N561Q	59
3.2.3	hTRPC3-E512N	63
3.3	Einzelkanalkonfiguration	66
3.3.1	hTRPC6.....	67
3.3.2	hTRPC6-N561Q.....	69
4.0	Diskussion	73
4.1	Zellkultur und Transfektion.....	74
4.2	Messung	74
4.3	Glykosylierung bestimmt Funktion und Oberflächenexpression	75
4.4	Die Aktivierung von hTRPC3 und hTRPC6.....	82
4.5	Physiologische Rolle von hTRPC3 und hTRPC6	84
4.6	Glykosylierung und Krankheit	85
5.	Zusammenfassung.....	89
6.	Literaturverzeichnis.....	90
7.	Tabellarischer Lebenslauf.....	108

8	Akademische Lehrer	111
9.	Danksagung	113
10.	Ehrenwörtliche Erklärung	114

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
BDNF	„brain-derived neurotrophic factor“
BSA	bovines Serumalbumin
C-	Carboxyl-
Ca ²⁺	Calcium-Ionenkonzentration
Calcium-ATPasen	plasmamembranständige Calcium-Pumpen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIRB domain	„calmodulin- IP ₃ -receptor-binding-domain“
CHO Zellen	„chinese hamster ovarial“ cells, chinesischen Hamster-Ovarial-Zellen
cmH ₂ O	cm Wassersäule
COP	„cytosolic coat proteins“, mit spezifischen Proteinen ausgestatte Vesikel zwischen ER und pre-GI
DAG	1,2-Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	extrazelluläre Schleife
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“, grün fluoreszierendes Protein
Edg	Endothel-Differenzierung-Gens
ER	endoplasmatisches Retikulum
F	Farad
FCS	fötales Kälberserum
GalNA	N-Acetylgalactosamin

Abkürzungsverzeichnis

GlcNAc	N-Acetylglucosamin
gp	aus dem Meerschweinchen
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
h	human
hAT ₁	humanen Angiotensin-II-Rezeptor Typ I
H ₁ R	Histamin-1-Rezeptor
HEK293	„human embrionic kidney cells“, Zelllinie aus humanen, embryonalen Nierenzellen
ICL	intrazelluläre Schleife
I _{CRAC}	“calcium-released activated current”
IP	Inositolphosphat
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP ₃ -R	IP ₃ -Rezeptor
Kv1.4, Kv1.1	spannungsgesteuerten Kalium-Kanälen
M	molar
m	aus der Maus
M ₅ R	muskarinischer M ₅ -Rezeptor
N	Newton
N-	Amino-
nACh-R	nikotinerge Acetylcholin Rezeptor
Osm	Osmolarität
p	Plasmid-
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
pre-GI	pre-Golgi-Intermediate, vesikuläre Strukturen zwischen ER und Golgi-Apparat

Abkürzungsverzeichnis

RNA	Ribonukleinsäure
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
ROC	„receptor-operated channel“, rezeptorgesteuerter Kanal
RTK	„Rezeptor-Tyrosin-Kinase“, Tyrosinkinase-Rezeptor
S	Siemens
SERCA	“smooth endoplasmatic reticulum calcium ATPase”, sarkoplasmamembranständige Calcium-Pumpen
sER	glattes („smooth“) endoplasmatisches Retikulum
SOC	„store-operated channel“, speichergesteuerter Kanal
Sph-1-P	Sphingosin-1-Phosphat
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
STAT-Proteine	„signal transducer and activator of transcription“ Proteine
STIM1	„stromal interacting molecule 1“, im Stroma ansässiges interagierendes Molekül 1
TRP	„transient receptor potential channel“
TRPC/M/V/L	„transient receptor potential canonical/melastatin/vanilloid/like channel“
TRPP	“transient receptor potential polycystic kidney disease channels”
TRPML	“transient receptor potential mucolipids channels”
V	Volt

1. Einleitung

Bei allen Aktionen, die Lebewesen als solche klassifizieren, sind diverse Regulationsmechanismen und Botenstoffe beteiligt. Auf ihrer korrekten Abstimmung beruhen alle zelluläre Prozesse wie Exkretion, Sekretion, Transmitterfreisetzung sowie Zellproliferation, Transkription und Apoptose. Diese Prozesse werden mittels Botenstoffe gesteuert. Ein Botenstoff hat die Aufgabe, Informationen zu übertragen und damit die Funktion der oben genannten Prozesse zu gewährleisten. Dabei sind hemmende wie stimulierende Eigenschaften der Botenstoffe bekannt. Als einer der wichtigsten Botenstoffe gelten die Calcium-Ionen, die sowohl extra- als auch intrazellulär vorkommen. Aufgrund ihrer Beteiligung an nahezu allen wichtigen zellulären Prozessen ist eine strikte Regulation und Kontrolle der freien Calcium-Ionenkonzentrationen unabdingbar. Nur so kann ein reibungsloser Ablauf der verschiedenen, von Calcium-Ionen getragenen Prozesse nebeneinander möglich sein. Es ist daher wichtig, die genauen Regulationsmechanismen von Calcium-Ionen als auch die an dieser Regulation beteiligten Strukturen aufzuklären.

1.1 Calcium-Ionen als intrazelluläre Botenstoffe

Besonders die freie intrazelluläre Calcium-Ionenkonzentration unterliegt einer genauen Kontrolle. Schon geringe Änderungen des intrazellulären Calciumgehaltes führen zu einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wobei Calcium-Ionen oft als intrazelluläre Botenstoffe extrazellulärer Signale dienen. Änderungen der intrazellulären Konzentration als auch die Dauer dieser Änderungen können zahlreiche zelluläre Prozesse einleiten.

Sowohl vom extrazellulären als auch vom intrazellulären Raum aus kann der zytosolische Calciumgehalt verändert werden. Zu den intrazellulären Speicherstrukturen zählen unter Anderem das *endoplasmatische Retikulum (ER)*, bei Muskelzellen das *sarkoplasmatische Retikulum (SR)* und die Mitochondrien.

Durch das Öffnen von Calcium leitenden Kanälen, die sich im ER oder in der Zellmembran befinden, wird die intrazelluläre Calcium-Ionenkonzentration verändert. Geöffnet werden diese Calcium leitenden Kanäle durch vielerlei intrazelluläre Botenstoffe wie Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren, wobei

verschiedene Rezeptoren für diese Botenstoffe bestehen. Eine Gruppe stellen die *G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR)* dar, eine andere die *Tyrosinkinase-Rezeptoren (Rezeptor-Tyrosin-Kinase, RTK)*. Gerade bei den GPCR spielt die β -Isoform der *Phospholipase C (PLC β)* eine große Rolle. Die PLC β wird von G-Proteinen der $G_{q/11}$ -Familie aktiviert. Das heterotrimere $G_{q/11}$ -Protein zerfällt in zwei von ihrer Funktion her unterschiedliche Bestandteile. Die α_q -Untereinheit aktiviert die PLC β , die $\beta\gamma$ -Untereinheit ist an der Aktivierung der PLC β nicht beteiligt. Bei den RTK ist eine andere Isoform der PLC vertreten, die PLC γ . Sie wird nicht über G-Proteine aktiviert, sondern direkt durch die RTK. Sie haben eine eigene Phosphorylierungs-Aktivität. Darüber ist es ihnen möglich, die PLC γ zu aktivieren.

Unabhängig von den verschiedenen Isoformen der PLC ist die von der PLC initiierte Signalkaskade. Wie Abbildung 1 zeigt, katalysiert PLC die Hydrolyse von *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$)*. PIP $_2$ liefert nach Hydrolyse zwei Spaltprodukte, das *1,2-Diacylglycerol (DAG)* und das *Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$)*. DAG aktiviert unter anderem die Proteinkinase C. IP $_3$ dagegen ist ein natürlicher Ligand von speziellen Rezeptoren in der Membran des ER, den IP $_3$ -Rezeptoren (IP $_3$ -R). Diese IP $_3$ -R stellen einen intrazellulären Calcium leitenden Kanal dar. Nach Bindung von IP $_3$ öffnet sich dieser Calcium leitende Kanal in der Membran des ER. Calcium gelangt aus seinem endoplasmatischen Speicherort in das Zytosol (Streb et al., 1986, Bezprozvanny et al., 1991).

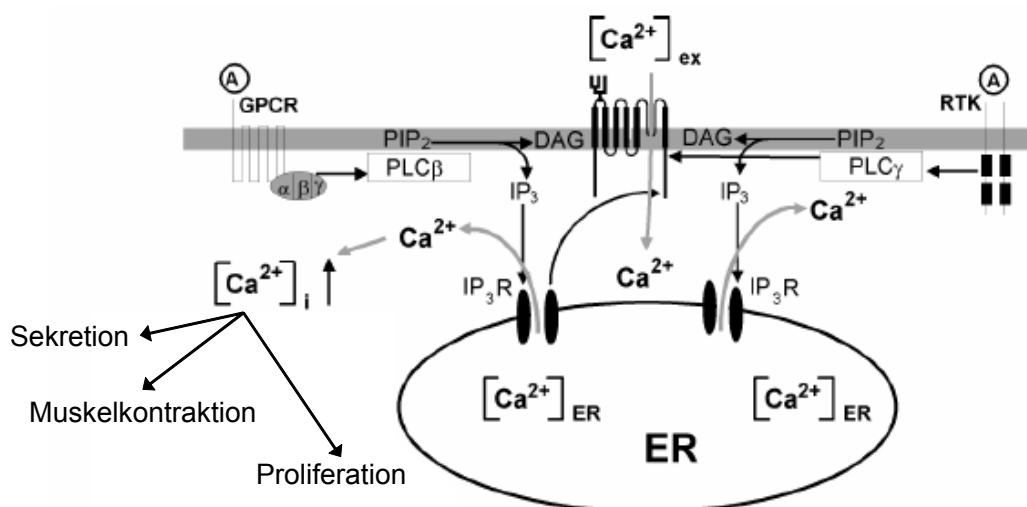


Abb. 1 Die verschiedenen Wege der Calciumfreisetzung: Über die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) als auch über die Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) wird das extrazelluläre Signal durch Aktivatoren (A) vermittelt und weitergegeben, indem die jeweilige Isoform der Phospholipase (PLC β

oder γ) aktiviert wird. Die Produkte der Aktivität der PLC sind Inositol-1,4,5-trisphosphat (**IP₃**) und Diacylglycerol (**DAG**). IP₃ führt nach Bindung an den IP₃-Rezeptor (**IP₃-R**) zur Öffnung membranständiger Calcium leitender Kanäle. Calcium-Ionen (**Ca²⁺**) gelangen aus dem endoplasmatischen Retikulum (**ER**) in das Zytosol und nehmen dort verschiedene Aufgaben wahr.

In Ruhe beträgt die zytosolische Konzentration von freiem Calcium etwa 10 bis 100 nM. Die Konzentration im Extrazellulärraum oder in intrazellulären Speicherorten wie ER oder SR sowie Mitochondrien erreichen 1,8 bis 2 mM. Der niedrige intrazelluläre Calciumspiegel wird einerseits durch plasmamembranständige Natrium-Calcium-Austauscher, andererseits durch Energie verbrauchende plasmamembranständige Calcium-Pumpen (Calcium-ATPasen) oder sarkoplasmamembranständige Calcium-Pumpen (SERCA) aufrechterhalten. Calcium-ATPasen pumpen Calcium-Ionen unter Verbrauch von Energie aus dem Zytosol in den extrazellulären Raum. Dagegen pumpen SERCA Calcium-Ionen in intrazelluläre Speicherorte. Zuletzt tragen im Zytosol vorliegende Calcium-Ionen bindende Proteine ebenfalls zur Aufrechterhaltung des intrazellulären Calciumspiegels bei.

1.2 TRP-Kanäle und ihre Entdeckung

Wie eingangs beschrieben, kann die Regulation des Calciumspiegels auf unterschiedlichsten Wegen erfolgen. Die ersten molekularen Korrelate des Calciumeinstroms wurden in den achtziger Jahren entdeckt und als spannungs- sowie ligandengesteuerte Ionenkanäle identifiziert. Mitte der neunziger Jahre wurde schließlich die molekulare Identität der Calcium leitenden Kationen-Kanäle entdeckt, die zu den rezeptorgesteuerten Kationen-Kanälen gehören. Nach Aktivierung von GPCR oder RTK bewirken die Calcium leitenden Kationen-Kanäle einen Calciumeinstrom.

Zu den rezeptorgesteuerten Kationen-Kanälen gehört die Gruppe der *transienten Rezeptorpotential-Kanälen (TRP)* bzw. die *transienten Rezeptorpotential-ähnlichen-Kanälen (TRPL)*. Entdeckt wurden die ersten Vertreter dieser Gruppe von Kanälen in den Genprodukten der Phototransduktion der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Montell et al., 1985 und Montell et al., 1989).

Diese Fruchtfliegen besitzen photosensible Zellen, deren für die Phototransduktion zuständige Zellteil in mehrere *Mikrovilli* ausläuft. Die Gesamtheit der Mikrovilli wird *Rhabdomer* benannt. Die einzelnen Mikrovilli bestehen aus einem

einzelnen *F-Aktin-Filament*. An dieses F-Aktin-Filament ist der für das Sehen zuständige Signalkomplex gebunden, der neben *Rhodopsin* auch aus TRP und TRPL-Kationen-Kanälen besteht.

Bei der Phototransduktion aktiviert Rhodopsin ein G_q -Protein, das daraufhin in seine Untereinheiten α_q und $\beta\gamma$ zerfällt. Die α_q -Untereinheit aktiviert seinerseits eine β -Isoform der Phospholipase C. Die wichtige Funktion der PLC β bei der Phototransduktion wurde durch Ausschaltung dieses Enzyms bewiesen. Fruchtfliegen, die eine Mutation der PLC β mit einhergehender Ausschaltung dieses Enzyms besitzen, werden als *norp A-Mutanten* bezeichnet. Wie aus der Abbildung 2 zu ersehen ist, konnte bei den *norp A*-Mutanten keine Reaktion auf einfallendes Licht festgestellt werden (Bloomquist et al., 1988). Die Aktivierung der PLC β führt über IP₃ und DAG zu einem vermehrten langdauernden Calcium- und kurzen initialen Natrium-Einstrom, was zur Depolarisation der photosensiblen Zelle führt. Calcium ist sowohl für die Depolarisation als auch für die Adaption auf den Lichtreiz verantwortlich (Montell, 1999 und Hardie et Raghu, 2001).

Mutanten der an der Phototransduktion beteiligten TRP-Kanälen, als *trp-Mutanten* bezeichnet, fielen phänotypisch durch ein verändertes Elektretinogramm auf. Sie zeigen im Gegensatz zu nicht mutierten Fruchtfliegen auf einen kontinuierlich andauernden Lichtreiz nur ein vorübergehendes (*transientes*) Rezeptorpotential im Elektretinogramm statt eines permanenten (Cosens et Manning, 1969). Genauere Untersuchungen zeigten, dass der initiale Natrium-Einstrom weiterhin besteht, aber der langanhaltende Calcium-Einstrom fehlt. Insgesamt besteht bei Lichtreizen ein 10-fach niedrigerer Calcium-Einstrom (Hardie et Minke, 1992). *trp*-Mutanten sind nach einigen Sekunden anhaltenden Lichtes nahezu blind. Weitere Untersuchungen an diesen *trp*-Mutanten zeigten, dass weitere von Calcium abhängige Zellvorgänge auch nur transient sind (Lo et Pak, 1981).

Die genetische Charakterisierung dieser *trp*-Mutanten führte zur Identifizierung des TRP-Gens. Das TRP-Gen kodiert für eine porenbildende Untereinheit eines nicht selektiven Calcium leitenden Kationen-Kanals in der Plasmamembran der photosensiblen Zellen. Da aber *trp*-Mutanten eine kurze, wenn auch nur transiente Reaktion auf Lichtreize aufwiesen, konnten die TRP-Kanäle nicht die einzigen an der Phototransduktion beteiligten Ionen-Kanäle sein. Diese Schlussfolgerungen führten zu der Entdeckung der TRPL- und TRP γ -Kanälen (Phillips et al., 1992; Xu et al., 2000).

TRPL- und TRP γ -Kanal-Proteine bilden Kationen-Kanäle mit nahezu gleicher Permeabilität für Calcium wie für Natrium (Hu et al., 1994). Im Vergleich dazu bilden TRP-Kanal-Proteine Kationen-Kanäle mit geringerer Selektivität für Calcium als für Natrium (Xu et al., 1997). TRP-Kanal-Proteine zeichnen sich durch eine PLC abhängige Aktivierbarkeit aus und können mit sich selbst Homotetramere, mit TRPL- und TRP γ -Kanal-Proteine Heterotetramere bilden (Montell, 2001).

Die Entdeckung dieser Kanäle sowie die Erkenntnis, dass die PLC für die Phototransduktion notwendig ist, initiierte die Suche nach entsprechenden Kanälen in Säugerzellen.

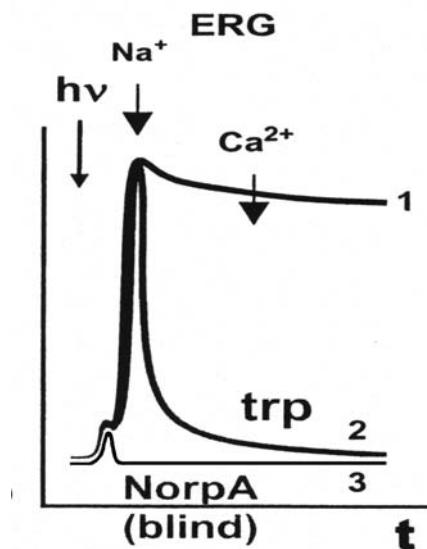


Abb. 2 Elektroretinogramm (ERG) von *Drosophila melanogaster*: Nach Einfall von Lichtenergie ($h\nu$) folgt der initiale kurze Natrium-Einstrom (Na^+) und der sich dann anschließende langdauernde Calcium-Einstrom (Ca^{2+}). Die erste Ableitung des ERG (1) zeigt die Lichtreaktion bei Wildtypen. Die zweite Ableitung des ERG (2) stellt die Lichtreaktion bei mutierten Fruchtfliegen dar, die Funktionsverlust-Mutationen der TRP-Kanäle aufweisen. Die dritte Ableitung (3) veranschaulicht die Lichtreaktion der norp A-Mutante, die eine Funktionsverlust-Mutation der PLC β besitzt.

1.3 Die TRP-Superfamilie und ihre Familien sowie Subfamilien

Anhand von Sequenzhomologievergleichen wurden weitere TRP-Gene in anderen Spezies entdeckt. Bei der Klasse der Säuger beinhaltet die TRP-Superfamilie 28 Vertreter, wie in Abbildung 4 veranschaulicht. Die TRP-Superfamilie lässt sich mittels Sequenzhomologie in sechs Familien unterteilen, die wiederum in mehrere Subfamilien eingeteilt werden können. So umfasst die Familie der *klassischen* TRP-Kanal-Proteine (TRPC, „classical“ oder „canonical“ TRP) sieben TRP-Gene, die *Vanilloid-Rezeptor ähnlichen* TRP-Kanal-Proteine (TRPV, „vanilloid“ TRP) sechs Gene und die der

Melastatin ähnlichen TRP-Kanal-Proteine (TRPM, „melastatin“ TRP) 8 Gene. Hinzu kommt die Familie für *polyzystische Nierenerkrankung* (PKD, „polycystic kidney disease proteins“, TRPP) mit drei Genen, die der ANKTM1-Kanal-Proteine mit einem Gen und schließlich die der *Mucolipide* („mucolipids“, TRPML) mit drei Genen. Die jeweiligen Familien werden kurz vorgestellt.

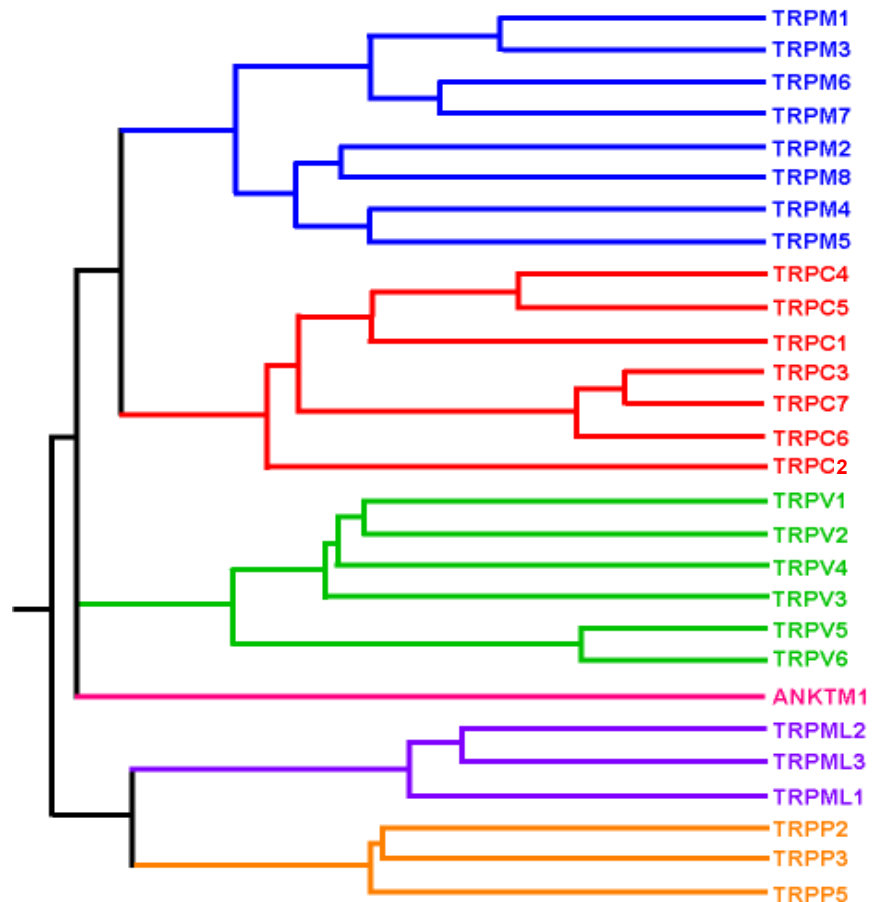


Abb. 3 Stammbaum der TRP-Proteine. Dargestellt ist die verwandtschaftliche Beziehung der einzelnen TRP-Familien. Die Darstellung begründet sich auf phylogenetischen Untersuchungen der konservierten Region der TRP-Superfamilie, nämlich von der ersten bis zur sechsten Transmembrandomäne. Dargestellt sind die drei großen TRP-Familien der TRPM („melastatin“)-, der TRPC („classical“)- und der TRPV („vanilloid receptor“)-Kanal-Proteine. Hinzu kommt noch die TRP-Familie der ANKTM1-Kanal-Proteine (auch TRPA genannt), die der Mucolipide (TRPML) und zuletzt die der polyzystischen Nierenerkrankungsproteine (TRPP).

Als erste TRP-Familie soll die TRPC („classical“)-Familie kurz beschrieben werden. Vertreter dieser TRPC-Familie haben die kürzeste Aminosäuresequenz aller TRP-Kanal-Proteine. Sie sind nicht selektive Calcium leitende Kationen-Kanäle. Anhand von weiteren Sequenzhomologien und funktionellen Gemeinsamkeiten können innerhalb der TRPC-Familie wiederum verschiedene Subfamilien eingeteilt werden. So

werden vier Subfamilien unterschieden: TRPC1, TRPC2 bilden jeweils eine eigene Subfamilie. TRPC4 und TRPC5 werden zu einer weiteren Subfamilie zusammengefasst. Die vierte Subfamilie stellen TRPC3, TRPC6 und TRPC7 dar.

Die zweite TRP-Familie ist die TRPV („vanilloid“-)Familie, die nach dem Vanilloidrezeptor 1 bezeichnet wird. Insgesamt sind sechs Vertreter dieser TRPV-Familie bekannt. TRPV1 wurde entdeckt, als Capsaicin, das als Scharfstoff in Pepperoni und Chilischoten vorkommt, als Ligand zur Aktivierung erkannt worden war. Es ist ein Calcium leitender Kationen-Kanal, der durch Hitze und niedrigen pH-Wert in seiner Aktivität gesteigert wird (Caterina et al., 1997; Jordt & Julius, 2002, Chuang et al., 2001). Diese Kanäle spielen eine große Rolle bei der Nozizeption und bei inflammatorischen Geschehen wie Verletzungen und Hitzeeinflüssen.

Als Nächstes wird die TRPP („polycystic kidney disease proteins“-)Familie beschrieben. Sie besteht aus drei Mitgliedern, TRPP2, TRPP3 und TRPP5. Diese sind Calcium leitende Kationen-Kanäle. Sie steuern vermutlich die Funktion von Kinozilien und sind somit für die Fertilität sowie für die Entwicklung unterschiedlicher Gewebe verantwortlich. Für die polyzystische Nierendegeneration vom autosomal-dominanten Typ (Potter III nach der Einteilung von Potter und Osathanondh), die im Erwachsenenalter zu zystischen Veränderungen beider Nieren mit konsekutiver Niereninsuffizienz führt, sind aller Wahrscheinlichkeit nach Funktionsverlust-Mutationen im Gen von TRPP2 verantwortlich (Wu et al., 1998; Boulter et al., 2001).

Die TRPML („mucolipids“-)Kanal-Proteine als die vierte TRP-Familie beinhaltet insgesamt drei Mitglieder. Sie sind nach Mukolipiden benannt und aller Wahrscheinlichkeit nach in intrazellulären Vesikeln gespeichert. Eine Mutation des ersten Vertreters TRPML1 konnte bei der Mukolipidose Typ IV nachgewiesen werden, einer lysosomalen Speicherkrankheit, die zur neuronalen Degeneration führt (Sun et al., 2000). TRPML3 kommt im Zytosol von Haarzellen und in Stereocilien vor. Ein Defekt dieses Kanals kann Taubheit und Pigmentationsstörungen hervorrufen (Di Palma et al., 2002).

Die fünfte und größte TRP-Familie ist die der TRPM („melastatin“-)Kanal-Proteine, die 8 Mitglieder zählt. Kurz dargestellt sei der erste Vertreter dieser Subfamilie, TRPM1, nach dem auch die gesamte TRP-Familie benannt worden ist. Dieser Kanal ist in Melanom-Zellen in seiner Expression herunterreguliert, so dass er den Namen „Melastatin“ bekam (Duncan et al., 1998). TRPM1 kommt in allen

normalen Gewebenarten vor. Seine Funktion und biophysikalischen Eigenschaften sind noch Gegenstand der Forschung.

Die letzte TRP-Familie wird aktuell nur durch ein Mitglied vertreten. Dieses Mitglied ist das ANKTM1-Kanal-Protein. Diese TRP-Familie wird auch TRPA-Familie genannt. Aktiviert wird dieser Kanal durch kalte Temperaturen unterhalb von 15°C. Er ist ein nicht selektiver Calcium leitender Kationen-Kanal (Tracey Jr., Wilson, Laurent & Benzer, 2003).

1.4 Die Struktur der TRP-Kanal-Proteine

Nach Analyse der Primärstruktur weisen alle TRP-Kanal-Proteine strukturelle Gemeinsamkeiten auf. Sämtliche Mitglieder zeichnen sich über sechs Transmembrandomänen (TM) mit intrazellulärem N- und C-Terminus aus. Damit weisen sie in der Membrantopologie Ähnlichkeit mit den spannungsgesteuerten Kalium-Kanälen auf (Yellen, 2002). Die Sequenzhomologien zwischen einzelnen Mitgliedern der TRP-Superfamilie können teilweise nur bei 20% liegen. Trotzdem besitzen sie gemeinsame, regional konservative Aminosäuresequenzen mit deutlich höherer Sequenzhomologie. Beispielsweise liegen innerhalb der intrazellulären N-Termini der TRPA-, TRPC- und TRPV-Familie sich wiederholende Ankyrinbindungssequenzen. Zudem weisen die TRPC- und TRPM-Familie prolinreiche Aminosäuresequenzen direkt hinter der fünften Transmembrandomäne auf (Clapham et al., 2001). Außerdem besitzen die TRPC- und TRPM-Familie eine C-terminal hinter der sechsten Transmembrandomäne liegende TRP-Domäne, bestehend aus 25 Aminosäuren. Diese TRP-Domäne umfasst die TRP-Box, deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. Wie aus Abbildung 3 zu ersehen ist, besteht eine TRP-Kanal-Untereinheit aus sechs Transmembrandomänen (S1 – S6). Dabei bilden vier TRP-Kanal-Untereinheiten einen funktionstüchtigen Kationen-Kanal. Das *P-Segment* umfasst die Transmembrandomänen S5 und S6 sowie die zwischen S5 und S6 liegende *Poren-Region*. Die Poren-Region definiert die Selektivität des Kationen-Kanals. Die Kationen erfahren bei ihrem Durchtritt durch den Kanal eine Selektion (Clapham et al., 2001).

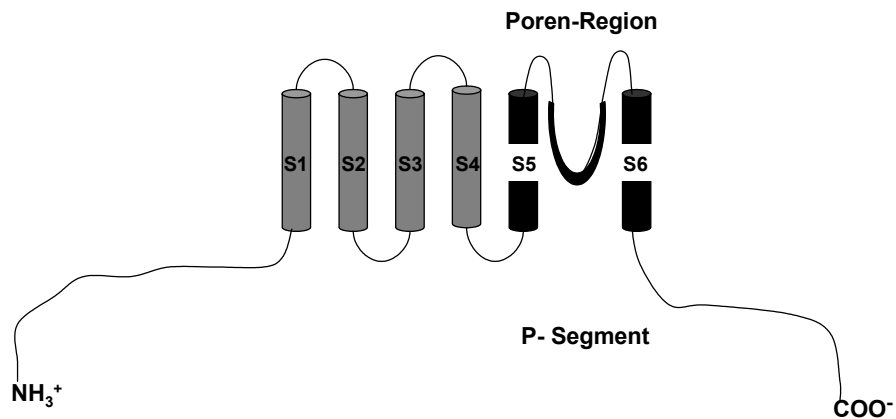


Abb. 4 Der Aufbau der TRP-Kanal-Untereinheit: Die Vertreter der TRP-Kanal-Familie besitzen sechs Transmembrandomänen (**S1 – S6**). Die Selektivität wird durch die **Poren-Region** definiert, die zwischen den Transmembrandomänen S5 und S6 liegt. Zusammen bilden die Transmembrandomänen S5 und S6 sowie die Poren-Region das **P-Segment**. Diversitäten zwischen den verschiedenen Subfamilien zeigen sich vor allem an dem jeweils unterschiedlich aufgebauten Amino- (NH_3^+) und Carboxy-Terminus (COO^-).

1.5 Die Funktion der TRP-Kanäle

Jeweils vier TRP-Kanal-Proteine bilden einen funktionstüchtigen Kationen-Kanal. Dieser Kationen-Kanal ist sowohl für monovalente als auch für divalente Kationen permeabel. Sie sind somit nicht selektiv und weisen einen Permeabilitätsquotienten $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} < 10$ auf. Als Ausnahmen gelten TRPM4- und TRPM5- sowie die TRPV5- und TRPV6-Kanal-Proteine. Die von den TRPM4,5-Kanal-Proteinen gebildeten Kationen-Kanäle sind ausschließlich für monovalente Kationen durchlässig. Im Gegensatz dazu sind die von TRPV5- und TRPV6-Kanal-Proteinen gebildeten Kationen-Kanäle nur für divalente Calciumionen durchlässig mit einem Permeabilitätsquotienten $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} > 100$. Die von den Mitgliedern der TRP-Superfamilie gebildeten Kationen-Kanäle weisen im Gegensatz zu spannungsabhängigen Calcium- und Natriumkanälen keine ausgeprägte Spannungsabhängigkeit auf (Clapham et al., 2001). Einzig bei TRPM4 und TRPM5 konnte durch Änderung der Spannung ein Effekt auf die Offenwahrscheinlichkeit der Kationen-Kanäle beschrieben werden (Hofmann et al., 2003).

1.6 TRP-Kanäle und ihre Aktivierung

Die physiologische Bedeutung der TRP-Kanäle ist noch nicht vollständig geklärt. Zunächst wurde angenommen, dass die von TRPC-Kanal-Proteinen gebildeten Kationen-Kanäle nach Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher einen Calciumeinstrom bewirken. Dieser Calciumeinstrom sollte die intrazellulären Calciumspeicher wieder auffüllen (Putney et McKay, 1999). Diese Theorie erscheint heute als unwahrscheinlich, da diese Kationen-Kanäle einen für diesen Zweck unzureichenden Calciumeinstrom gewährleisten. Dagegen hat der durch diese Kationen-Kanäle gewährleistete Natriumeinstrom an Bedeutung gewonnen. Der Natriumeinstrom ist groß genug, um Membrandepolarisationen hervorzurufen. Es wird vermutet, dass diese Membrandepolarisation spannungsabhängige Calciumkanäle in erregbaren Zellen triggern. Zudem ist der genaue Aktivierungsmechanismus der von TRPC-Kanal-Proteinen gebildete Kationen-Kanal noch ungeklärt. Zwei Aktivierungsmechanismen stehen einander gegenüber. Zum Einen besteht die Möglichkeit einer rezeptorgesteuerten Aktivierung über „*receptor-operated channels*“ (ROC). Diese Aktivierung beginnt mit der Stimulation von GPCR oder RTK. Die beiden Botenstoffe IP₃ und DAG entstehen (siehe dazu 1.1). Dabei kann DAG die Mitglieder der TRPC3,6,7-Subfamilie direkt ohne Beteiligung der Proteinkinase C aktivieren (Hofmann et al., 1999). Zum Anderen besteht die Möglichkeit eines speichergesteuerten Aktivierungsmechanismus über „*store-operated channels*“ (SOC). Zunächst entleeren sich intrazelluläre Calciumspeicher wie das ER, SR oder Mitochondrien. Daraufhin werden die TRPC-Kanäle auf noch ungeklärte Weise aktiviert. Drei verschiedene Wege zur Aktivierung des SOC werden aktuell diskutiert. Auf dem ersten Weg wird ein noch nicht identifizierter Botenstoff, „*calcium influx factor*“ oder „*diffusible factor*“ genannt, aus dem SR freigesetzt, der nun seinerseits SOC direkt aktivieren kann oder über die Aktivierung der Phospholipase A₂ zur Freisetzung von Lysophospholipiden führt, die nun ihrerseits SOC aktivieren können. Auf dem zweiten Weg ändern die Calcium freisetzenden Kanäle – beispielsweise die IP₃-R am ER - ihre Konformität. Diese Konformitätsänderung bewirkt wiederum eine Konformitätsänderung des SOC in seine aktive Kanalkonfiguration. Zwischen IP₃-R und SOC muss demzufolge eine direkte Protein-Protein-Interaktion stattfinden. Auf dem letzten Weg liegen die SOC in kleinen zytosolischen Vesikeln direkt unterhalb der Plasmamembran vor. Eine Calciumfreisetzung bewirkt eine Verschmelzung dieser

Vesikel mit der Plasmamembran, so dass SOC in der Plasmamembran eingebaut werden und nun speichergesteuert fungieren.

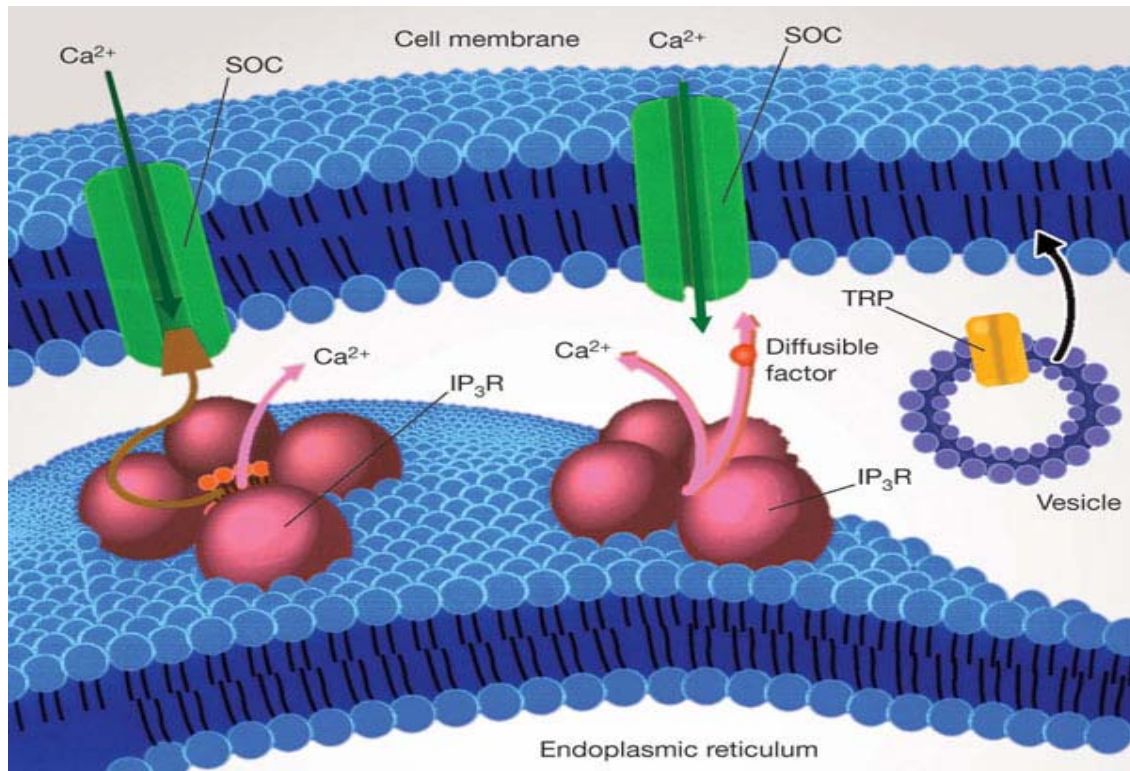


Abb. 5 Aktivierungsmechanismus über „store-operated channels“ (SOC). Zum Einen führt die Freisetzung von Calcium (Ca^{2+}) zu einer Konformitätsänderung von IP₃-Rezeptoren (IP₃-R), die dann ihrerseits über eine direkte Protein-Protein-Interaktion zu einer Konformitätsänderung des SOC führen. Zum Anderen wird mit Calcium ein intrazelluläres Molekül (**diffusible factor**) freigesetzt, der hier direkt SOC aktiviert. Als letzte Möglichkeit der Aktivierung werden bei der Calciumfreisetzung in Vesikeln (**vesicle**) gespeicherte TRP-Kanäle (**TRP**) in die Plasmamembran eingebaut. Dadurch wird der speichergesteuerte Calciumeinstrom reguliert (Abbildung aus Clapham (2003) TRP channels as cellular sensors, Nature, 426).

Für diese Vesikel-Hypothese ist jedoch bislang weder ein Mechanismus noch ein Kanal identifiziert worden (Patterson et al, 1999; Yao et al, 1999). Ein Hinweis auf die tatsächliche Existenz eines solchen Mechanismus findet sich in der Fertilisation von Spermatiden von *C. elegans*. Damit die Spermatiden reifen können, ist die Translokation von TRP-Kanälen, die sich intrazellulär in der Membran von Vesikeln befinden, auf die Plasmamembran notwendig (Xu et al, 2003). Diese Entdeckung wirft allerdings die Frage auf, ob TRP-Kanäle erst bei entsprechenden Stimuli in die Plasmamembran inserieren.

Neben TRPC-Kanal-Proteinen für den SOC werden weitere Kanäle diskutiert. Das beste Beispiel hierfür ist ein hochselektiver Calcium leitender Kationen-Kanal, der in Mastzellen (Hoth et Penner, 1992/93) und in T-Lymphozyten (Zweifach et Lewis, 1995) vorkommt. Dieser Kationen-Kanal ruft einen Strom hervor, der als I_{CRAC} („*calcium-released activated current*“) bezeichnet wird. Ob TRPC-Kanal-Proteine daran beteiligt sind, bleibt bisher ungeklärt. Allerdings scheinen das „*stromal interacting molecule 1*“ (STIM1) und das Protein Orai1 für diesen Strom verantwortlich zu sein (Luik et al., 2006). STIM1 ist auf dem ER lokalisiert. Orai1 hingegen liegt in der Zellmembran, besteht aus vier Transmembrandomänen mit einem intrazellulären C- und N-Terminus. Orai1 ist aller Wahrscheinlichkeit essentieller Bestandteil des *CRAC-Kationen-Kanals*. Entleeren sich die Calciumspeicher des ER beispielsweise durch Aktivierung der IP_3 -R, akkumulieren mehrere STIM1-Proteine zu Clustern. Diese Cluster befinden sich auf den Stellen des ER, die nur 15 – 25 nm von der Zellmembran entfernt sind. Diese Stellen des ER werden auch „*junctional ER*“ genannt. Zur gleichen Zeit akkumulieren mehrere Orai1-Proteine in den dem „*junctional ER*“ gegenüberliegenden Stellen der Zellmembran. Man vermutet eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen STIM1 und Orai1, was zum Öffnen der CRAC-Kationen-Kanäle führt (Lewis, 2007).

1.7 TRP-Kanäle und ihre Präsenz

Diese TRP-Familien weisen neben ihren strukturellen Unterschieden auch eine unterschiedliche Gewebeverteilung auf. So sind Vertreter der TRPC-Subfamilie vor allem in gonadalen Geweben, im Herzen und im Gehirn aufzufinden (Zhu et al., 1995). Auch in glatten Muskelzellen der Lunge und in der Milz sind TRPC-Kanäle nachzuweisen (Hofmann et al., 2000).

Die verschiedenen Vertreter der TRPC-Subfamilie kommen in jeweils bestimmten Gewebetypen vor, wie in Abbildung 5 dargestellt. TRPC1, das erste entdeckte TRP-Kanal-Protein des Säugers (Wes et al., 1995) kommt in allen Gewebetypen vor. TRPC2 ist hingegen im Vomeronasalorgan lokalisiert (Liman et al., 1999). Dieser Kanal ist an der Wirkung der Pheromone beteiligt (Kelliher et al., 2006). Die TRPC3,6,7-Subfamilie wird vor allem in der glatten und kardialen Muskulatur exprimiert. Beim Kaninchen kommt TRPC6 auch in den Muskelzellen der Portalvene in hohen Konzentrationen vor (Inoue et al., 2001). In der glatten Muskulatur der

1. Einleitung

Lungengefäße ist vor allem TRPC4 repräsentiert. Dieser Kanal steuert die Vasoregulation und die Permeabilität der Lungengefäße (Freichel et al., 2001; Tirupathi et al., 2002). TRPC4 wird über G-Proteine der $G_{q/11}$ -Familie aktiviert und inhibiert (Otsuguro et al., 2008). TRPC5 kommt dagegen im Bereich des Hippocampus vor und reguliert hier die Funktion von Neuriten (Greka et al., 2003).

Kanal	Funktion	Interagierende Proteine
TRPC1	Zentrales Nervensystem,	TRPC4, TRPC5 TRPC3 (Embryo), Calmodulin, IP ₃ , Caveolin-1,
TRPC2	Sensoren für Pheromone	TRPC1, PLCβ, IP ₃
TRPC3	Vasoregulation, Arterienwiderstand, Atemwegsregulation, Zentrales Nervensystem	Ryanodinrezeptor, Caveolin-1, Calmodulin
TRPC4	Vasoregulation, Permeabilität der Gefäße, Zentrales Nervensystem, Motilität des Gastrointestinaltraktes	TRPC1, TRPC5, PLCβ, über die PDZ-bindende Domäne, IP ₃ , Calmodulin
TRPC5	Zentrales Nervensystem, Wachstum	TRPC1, TRPC4, Calmodulin, PLCβ, Stathmin
TRPC6	Vasoregulation, Arterienwiderstand, Atemwegsregulation Regulation glatter Muskelzellen	TRPC3, TRPC7, Calmodulin
TRPC7	Vasoregulation, Atemwegsregulation, Regulation glatter Muskelzellen	TRPC3, TRPC6, Calmodulin
TRPV1	Sensoren für Hitze und Schärfe, Entzündungsmechanismen, Sensoren für die Blasenfüllung	TRPV3, Calmodulin
TRPV2	Sensoren für Hitzeschädigung, Muskeldegeneration, Schmerzweiterleitung	
TRPV3	Wärmesensoren, Schmerzwahrnehmung	TRPV1
TRPV4	Osmotische Sensoren im Zentralen Nervensystem, Drucksensoren, Nozizeption, Wärmesensoren	Calmodulin, Src-Kinasen
TRPV5	Calcium-Aufnahme in der Niere und im Darm	TRPV6, S100A10/Annexin2
TRPV6	Calcium-Aufnahme im Darm	TRPV5, S100A10/Annexin2

TRPM1	In jeglichem normalen Gewebe	
TRPM2	Sensor für oxidativen Stress	
TRPM3	Calcium-Aufnahme in der Niere	
TRPM4	Arterielle Vasokonstriktion	
TRPM5	Sensoren für Geschmack	
TRPM6	Magnesium-Aufnahme in der Niere und im Darm	
TRPM7	Magnesium-Homeostase der Zelle	PLC β 1, PLC β 2, PLC β 3, PLC γ 1
TRPM8	Kältesensoren, Krebsentwicklung	
ANKTM1	Kältesensoren	
TRPP2	Mechanosensoren in Zilien, Fertilität	PC1, Cortactin
TRPP3	Entwicklung der Niere und der Retina	
TRPP5	Physiologische Rolle noch unklar	

Abb. 6 TRP-Kanäle und ihr Vorkommen: Aufgezeigt sind die einzelnen TRP-Kanal-Proteine und ihr Vorkommen in den verschiedenen Geweben. Ferner sind die mit ihnen interagierenden Proteine aufgelistet.

1.8 TRP-Kanal-Proteine und ihre Multimerisierung

Seit der Entdeckung der TRP-Kanal-Proteine bei der Entschlüsselung der Sehprozesse von *Drosophila melanogaster* (Montell et al., 1989) und ihrer Säugerhomologe (Wes et al., 1995; Zhu et al., 1996; Philipp et al., 1998; Liman et al., 1999; Okada et al., 1999), wurden diese TRP-Kanal-Proteine als Untereinheiten von rezeptorgesteuerten oder speichergesteuerten Kationen-Kanälen charakterisiert. Zur Bildung eines funktionsfähigen Kanals müssen TRP-Kanal-Proteine ein Tetramer bilden. Dabei können Homo- und Heterotetramere gebildet werden. Die Fähigkeit zur Multimerisierung wurde zuerst für die TRPC-Proteine gezeigt (Vannier et al., 2001). So können die einzelnen Mitglieder der unterschiedlichen Subfamilien miteinander funktionstüchtige Kanäle bilden, allerdings nur in bestimmten Kombinationen. So konnte gezeigt werden, dass entgegen der Annahme, das humane (h) hTRPC1-Kanal-Protein könne mit hTRPC3 multimerisieren (Xu et al., 1997; Lintschinger et al., 1998), hTRPC1 nur mit hTRPC4 oder hTRPC5 ein Heterotetramer bilden konnte (Hofmann et

al, 2002). hTRPC3/6/7 können als Mitglieder derselben Subfamilie mit sich selbst oder untereinander funktionsfähige Kationen-Kanäle bilden. Die gleiche Möglichkeit besteht auch zwischen hTRPC4/5 als Mitglieder einer eigenen Subfamilie. hTRPC2 kann nur mit sich selbst interagieren (Hofmann et al., 2001).

1.9 Glykosylierung und ihre Grundprinzipien

Vor allem eukaryote Zellen weisen einen hoch spezialisierten Mechanismus auf, der nach stattgehabter Proteinbiosynthese die einzelnen Proteine modifiziert, zu größeren Komplexen arrangiert und sie ihren exakten Bestimmungsorten zuweist. Dieses hochspezialisierte System besteht aus mehreren Einzelbestandteilen wie dem ER, dem *Golgi-Apparat* und verschiedenen *Vesikeln* und *Transportmechanismen*. All diese Einzelbestandteile bilden den Sekretionsweg für Proteine („*secretory pathway*“).

Das ER repräsentiert dabei den größten Anteil an diesem „*secretory pathway*“ und ist in seiner Funktion weniger eine statische als vielmehr dynamische Organelle (Powell et al., 2000; Gething et al., 1990; Johnson et al., 1999; Pelham et al., 1996). Es ist in drei Untereinheiten einteilbar: das *raue* („*rough*“) *endoplasmatische Retikulum* (*rER*), das mit Ribosomen besetzt ist, das *glatte* („*smooth*“) *endoplasmatische Retikulum* (*sER*), das keine Ribosomen mehr aufweist, und die kernnahen Schichten des ER („*nuclear envelope*“). Innerhalb des Zytosols sind diese einzelnen Bestandteile als miteinander verbundene *Tubuli* und *Cisternae* angeordnet (Cole et al., 1996; Nehls et al., 2000). Zwischen dem Golgi-Apparat und dem ER existieren *pre-Golgi-Intermediate* (*pre-GI*). Diese sind höchst dynamische Strukturen, die auch kernfern vorkommen (Presley et al., 1997; Scales et al., 1997; Stephens et al., 2000; Lippincott-Schwartz et al., 2000). Mittels spezifischer, mit „*cytosolic coat proteins*“ (*COP*) ausgestatteter Vesikel werden die verschiedenen Proteine vom ER zu den pre-GI transportiert (Aridor et al., 2001; Bednarek et al., 1995). Dieser Transport kann anterograd als auch retrograd verlaufen. Von den pre-GI verläuft der Transport dann zum Golgi-Apparat. Er nimmt die zentrale Rolle sowohl der posttranslationalen Modifikation der Proteine als auch ihres Transports zum eigentlichen Bestimmungsort ein. Dies betrifft sowohl Sekretions- und Membranproteine als auch lysosomale Enzyme (Farquhar et al., 1997; Lippincott-Schwartz et al., 2001).

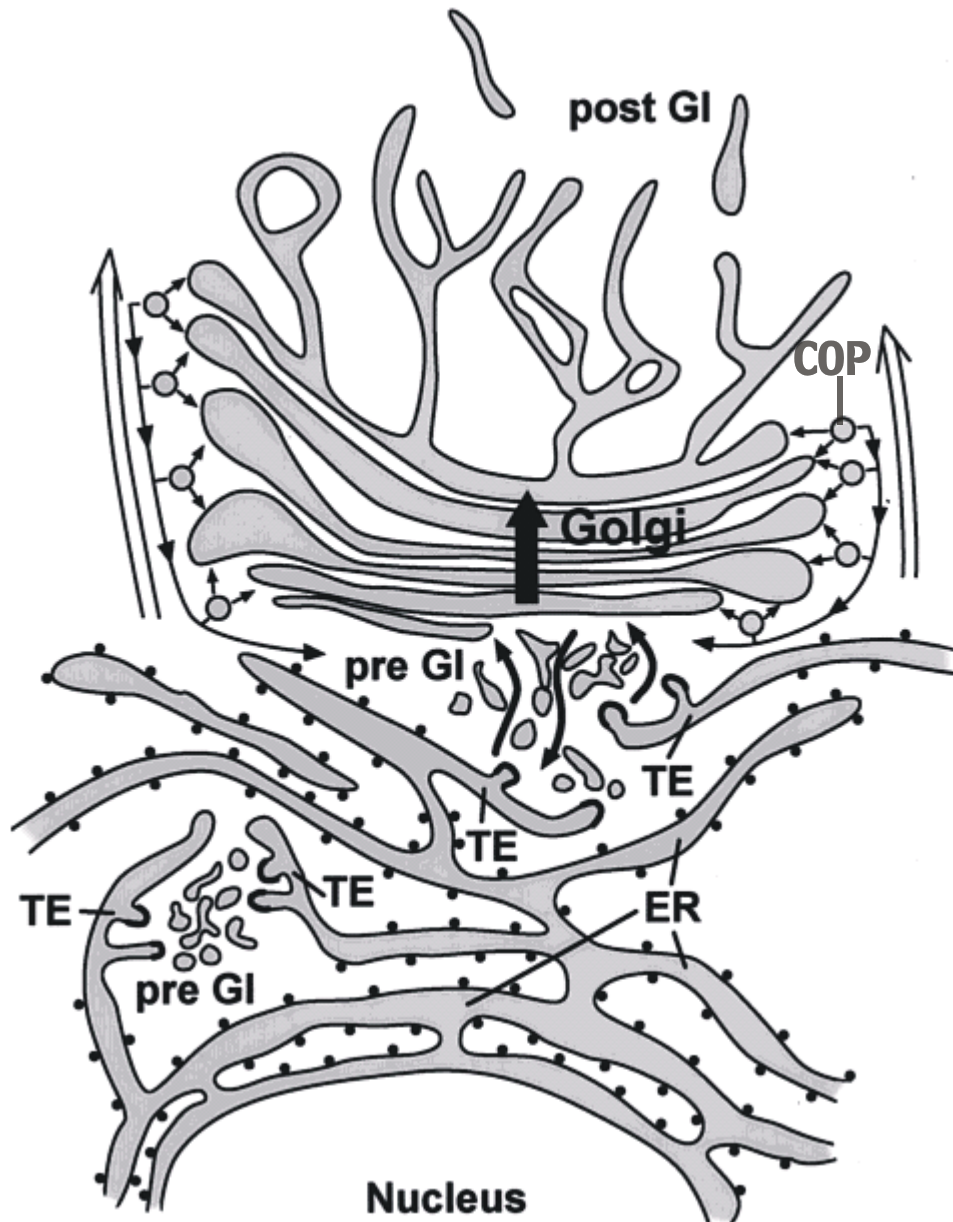


Abb. 7 Strukturelle Bestandteile der posttranslationalen Modifikation der Proteine: Dargestellt sind neben dem Kern (Nucleus) das endoplasmatische Retikulum (ER), die transitionalen Elemente (TE), die als cytosol coated proteins (COP) die Verbindung zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat herstellen, und die pre-Golgi-Intermediates (pre-GI), die post-Golgi-Intermediates (post-GI) sowie der Golgi-Apparat (Golgi) selbst.

1.9.1 Posttranslationale Modifikation der Proteine

Schon bei laufender Proteinbiosynthese im rER werden Zuckerbestandteile an die gebildeten Proteine angehängt (co-translationale Modifikation). Allerdings sind diese ersten Glykosylierungsschritte nicht endgültig, sondern werden in weiteren Schritten durch verschiedenen Enzyme verändert. Diese ersten Glykosylierungsstrukturen sind

dabei in ihrem Aufbau bei vielen Lebewesen gleich (Hirschberg et al., 1987; Verbert et al., 1995; Burda et al., 1999). Noch im ER, vor allem aber in den pre-GI und im Golgi-Apparat werden die ersten Glykosylierungsstrukturen weiteren Modifikationen unterworfen. So werden durch die *Glukosidase I* und *II* mehrere Glukosebestandteile der ersten Glykosylierungsstruktur entfernt. Mittels der *UDP-Glykoprotein-Glykosyltransferase* findet eine vorübergehende Re-Glykosylierung statt. Währenddessen entfernt die *Mannosidase* Mannose-Strukturen (Herscovics, 1999). Die letzten Modifikationen werden schließlich durch verschiedenen *Endomannosidasen*, *Mannosidasen* und *Glykosyltransferasen* herbeigeführt.

Durch diese verschiedenen Modifikationen der synthetisierten Sekretions- und Membranproteine wird auf der einen Seite die korrekte Multimerisierung und Assemblierung der einzelnen Proteine gewährleistet, auf der andere Seite der korrekte Bestimmungsort angesteuert (Ellgaard et al., 1999; Wickner, 1999; Hammond et al., 1994; Kopito et al., 1997). Diese posttranslationalen Mechanismen können allerdings in ihrer Funktion durch zellulären Stress beeinträchtigt werden (Vidair et al., 1966; Buchner et al., 1996; Kuznetsov et al., 1996). Fehlerhafte Glykoproteinstrukturen werden während des Zusammenbaus durch *Hitzeschockproteine (Chaperone)* korrigiert (Benham et al., 2000; Chevet et al., 2001; Fink et al., 1999). Wenn dieser Regulationsmechanismus nicht mehr greifen kann, werden die fehlerhaften Glykoproteine durch das im Zytosol befindliche *Proteasom* abgebaut (Sommer et al., 1997; Plemper et al., 1999; Bonifacino et al., 1998; Voges et al., 1999; Brodsky et al., 1999).

Sollten diese Regulationsmechanismen nicht korrekt arbeiten, können diese fehlerhaften Glykoproteine nicht abgebaut werden. Daraus können Erkrankungen resultieren, die aufgrund ihrer congenitalen Vererbungsweise eine familiäre Häufigkeit aufweisen (Aridor et al., 1999; Kim et al., 1998; Riordan et al., 1999; Sifers et al., 1995). Als bekannte Beispiele seien die Tay-Sachs-Krankheit sowie der Morbus Niemann-Pick genannt, bei denen aufgrund eines Enzymdefekts der Abbau bestimmter Glykoproteine gestört ist. Bei der Tay-Sachs-Krankheit liegt eine fehlerhafte β -Hexosaminidase A, bei Niemann-Pick eine fehlerhafte Sphingomyelinase vor (Raymond et al., 2002)

1.9.2 O-Glykosylierung

Bei der O-Glykosylierung werden die Oligosaccharide an die Aminosäure, Serin (S), Threonin (T) oder Tryptophan (W) gekoppelt. Der erste Bestandteil ist in der Regel das *N-Acetylgalactosamin* (*GalNAc*). Allerdings bestehen im Gegensatz zur N-Glykosylierung keine spezifischen Peptidstrukturen. Threonin wird als Ankopplungsstelle dem Serin vorgezogen (Elhammer et al., 1993). Auch hier unterliegen die entstehenden Oligosaccharidstrukturen zahlreichen Modifikationen.

Serin(S)/Threonin (T)/Tryptophan (W) – α/β – Acetylgalactosamin (GalNAc)

Serin und Threonin sowie Tryptophan sind als Bindungsstellen notwendig, wie oben dargestellt. Die Oligosaccharide werden hier über eine α - oder β -glykosidische Bindung mit dem jeweiligen Protein verbunden.

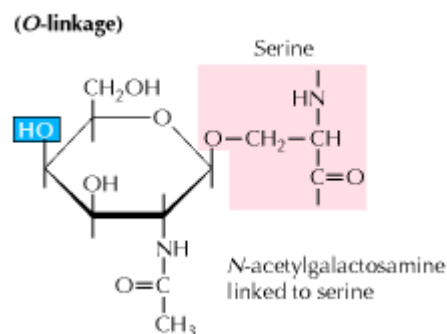


Abb. 8 O-Glykosylierung. Schematisch ist die O-Glykosylierung („O-linkage“) dargestellt. Erster Bestandteil ist N-Acetylgalactosamin („N-acetylgalactosamine“), an Serin („Serine“) gebunden.

Ein Motiv einer O-Glycosylierung ist beispielsweise (W/S)X(W/S), wobei X eine beliebige Aminosäure sein kann. Dieses Motiv weisen potentielle O-Glykosylierungsstellen im Zytosol vorliegender Transkriptionsproteine auf, die allgemein als *STAT-* („*signal transducer and activator of transcription*“) Proteine bezeichnet werden (Gewinner, 2001).

1.9.3 Phosphoglykosylierung

Die Phosphoglykosylierung beinhaltet das Anhängen von Zuckermolekülen an die Peptidkette über eine Phosphodiester-Brücke (Haynes, 1998). Diese Art der Glykosylierung wurde in der Proteinase 1 nachgewiesen (Mehta et al., 1996). Als Enzym konnte die *N-Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase* identifiziert werden, die als ersten Bestandteil in der Regel *N-Acetylglucosamin (GlcNAc)* überträgt (Merello et al., 1995). Mannose kann ebenfalls als erster Bestandteil übertragen werden. Das zuständige Enzym ist die *Mannose-1-phosphotransferase* (Moss et al., 1999).

Serin(S)/Threonin(T) – α – Acetylgalactosamin (GalNAc)

Serin oder Threonin stellen hier ebenfalls die Bindungsstellen dar. Die Oligosaccharide werden über eine α -glykosidische Bindung mit dem jeweiligen Protein verbunden. Eine Motiv wie bei der N- und eingeschränkt bei der O-Glykosylierung gibt es nicht.

1.9.4 N-Glykosylierung

Bei der N-Glykosylierung werden die Oligosaccharidstrukturen über die Aminosäure Asparagin an die jeweilige Protein gekoppelt, wobei der erste Bestandteil das N-Acetylglucosamin (GlcNAc) ist (Lechner und Wieland, 1989; Messner, 1997). Oligosaccharidstrukturen können ebenfalls über Arginin an Proteine gekoppelt werden (Singh et al., 1995) Bei Eukaryoten werden diese Oligosaccharide in der Regel an *Dolichol*, einem Derivat des Isoprenols, gebunden. Sie bestehen zumeist aus mehreren Mannose-Molekülen, die zusätzlich drei Glucose-Bausteine besitzen. Die im Aufbau befindlichen Oligosaccharid-Strukturen unterliegen dabei zahlreichen Modifizierungen. (Cummings et al., 1992; Moremen et al., 1994; Burda and Aebi; 1999; Spiro et al., 2000). Proteine, die mit Oligosaccharid-Strukturen versehen werden sollen, weisen eine folgende Bindungsstelle auf:

Asparagin (N) – β – Acetylglucosamin (GlcNAc)

Asparagin stellt dabei die Enzymbindungsstelle dar. Die Oligosaccharide werden über eine β -glykosidische Bindung mit dem jeweiligen Protein verbunden.

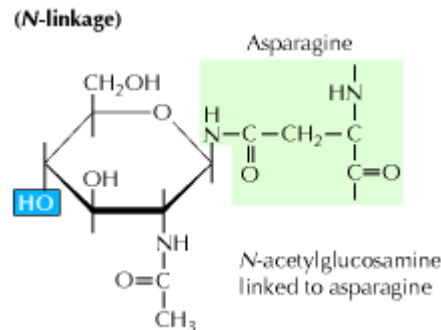


Abb. 9 N-Glykosylierung. Schematisch ist die N-Glykosylierung („N-linkage“) dargestellt. Erster Bestandteil ist N-Acetylglucosamin („N-acetylglucosamine“), an Asparagin („Asparagine“) gebunden.

Als Beispiel einer N-Glykosylierung wird hier das Motiv für hTRPC3 beschrieben: hTRPC3 besteht aus 848 Aminosäuren, weist sieben hydrophobe Regionen auf und sechs potentielle endogene Glykosylierungsstellen. Das Motiv der potentiellen Glykosylierungsstellen ist NX(S/T), wobei X eine beliebige Aminosäure sein kann (Vannier et al., 1998).

1.9.5 Vorkommen der verschiedenen Glykosylierungen

Die N-Glykosylierung war zuerst im Ovalbumin, einem Protein, das 60 – 65% des Proteingehalts von Eiweiß ausmacht, beschrieben worden (Johanson et al., 1961). Dort waren die Oligosaccharide über eine β -glykosidische Bindung mit dem jeweiligen Protein verbunden, wobei Asparagin die Bindungsstelle darstellte. Die N-Glykosylierung kommt bei einer Großzahl von eukaryoten Proteinen vor. So lassen sich bei Plasmaproteinen, Thyreoglobulin, Hormonen, Enzymen sowie Rezeptoren der Zelloberfläche und Immunglobulinen eine N-Glykosylierung nachweisen (Spiro, 1973; Montreuil, 1980). Eine O-Glykosylierung weisen dagegen das IgG-Immunglobulin, die Mannoproteine der Brust, der Insulin-Rezeptor, die Glykoproteine der Schilddrüsenzellen sowie die Muzine, Glykoproteine der Schleimhäute, und Proteoglykane auf (Fanger und Smyth, 1972; Herscovic und Orlean, 1993; Collier und Gordon, 1991; Edge und Spiro, 1997; Perez-Vilar et al., 1996; Lohmander et al., 1980;

Parthasarathy und Spiro, 1984). Die Phosphoglykosylierung ließ sich vor allem an tierischen Proteinen nachweisen. So weisen Proteine von *Leishmania donovani* und *Trypanosoma cruzi* diese Art der Glykosylierung auf (Guha-Niyogi et al., 2001; Haynes 1998).

Bei den hier untersuchten TRP-Kanal-Proteinen liegt eine N-Glykosylierung vor. Die Oligosacchariden werden ebenfalls über Asparagin an die Proteinstrukturen gebunden. Durch Austausch von Asparagin mit anderen Aminosäuren kann die Glykosylierung des jeweiligen TRP-Kanal-Proteins geändert werden und damit auch die biophysikalische Eigenschaften der von ihnen gebildeten Kationen-Kanäle, was Gegenstand dieser Arbeit ist.

1.9.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss des Glykosylierungsmusters auf die biophysikalischen Eigenschaften der humanen (h) hTRPC-Subfamilie hTRPC3, hTRPC6 und hTRPC7 sowie deren Glykosylierungsmutanten hTRPC3-E512N, hTRPC6-N561Q und hTRPC6-N473Q-N561Q. Untersucht wurden dabei folgende biophysikalische Merkmale:

- die Stromdichte
- die Basalaktivität
- Strom-Spannungskurven
- das Umkehrpotential
- der Stromverlauf

Folgende Aufgaben waren gestellt:

1. Elektrophysiologische Charakterisierung aller Homo-sapiens-Vertreter der hTRPC-Subfamilie hTRPC3, hTRPC6 und hTRPC7 in der Ganzzellkonfiguration.
2. Elektrophysiologische Charakterisierung der Glykosylierungsmutanten hTRPC3-E512N sowie hTRPC6-N561Q, hTRPC6-N473Q und hTRPC6-N473Q-N561Q in der Ganzzellkonfiguration.
3. Elektrophysiologische Charakterisierung von hTRPC6 sowie deren Glykosylierungsmutante hTRPC6-N561Q in der Einzelkanalkonfiguration.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien:

2.1.1 Verbrauchsmaterialien:

Substanz	Hersteller
BAPTA (1,2-Bis(aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Sigma
CaCl ₂	Sigma
CsCl	Sigma
Caesiummethansulfon	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
EDTA (Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz)	Sigma
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure)	Sigma
KCl	Sigma
MgCl	Sigma
MgCl ₂	Sigma
NaCl	Sigma

2.1.2 Reagenzien und Enzyme:

Substanz	Hersteller
BSA („bovine serum albumine“, Rinderserumalbumin)	Sigma
Fugene6 [®] (Transfectionsmedium)	Roche
Polylysin	Sigma

2.1.3 Agonisten und Pharmaka:

Substanz	Hersteller
Carbachol	Sigma
Histamin	Sigma
SAG (1-Stearoyl-2-arachidonyl- <i>sn</i> -glycerol)	Sigma

2.2 Elektrophysiologie

Für die Messung der durch die hTRPC3,6 und 7 gebildeten Calcium leitenden Kationen-Kanäle wurde die Patch-Clamp-Methode herangezogen. Alle Messungen fanden bei einer Raumtemperatur von ca. 23°C statt. Zur Messdurchführung wurde ein inverses Mikroskop (Olympus IX 70) benutzt, wie Abbildung 10 zeigt. Die HEK293 Zellen - eine Zelllinie aus menschlichen embryonalen Nierenzellen („*human embryonic kidney cells*“) - wurden nach einer Transfektionszeit von 24 h – 72 h gemessen, nachdem sie ca. eine Stunde vorher mittels 0,02%igen EDTA-haltiger 0,05%ige Trypsinlösung vom Boden abgelöst, durch An- und Absaugen über eine blaue Pipettenspitze mechanisch vereinzelt und in 10 einzelne 33 mm Kulturschälchen verteilt wurden.

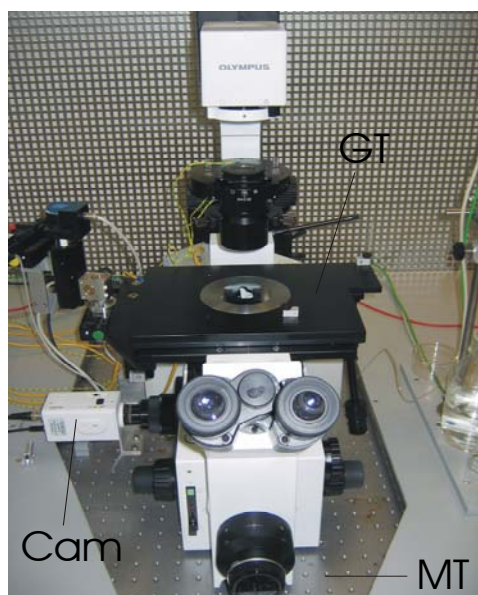


Abb. 10 Das Mikroskop. Die Abbildung zeigt das inverse Mikroskop (Olympus IX 70), befestigt auf dem Messtisch (**MT**). Angeschlossen ist eine Kamera (**Cam**), die wiederum mit einem kleinen Monitor verbunden ist. Das Mikroskop selbst verfügt über einen Tisch ,der Gleitbewegungen (**GT**) in zwei Ebenen ausführen kann. Mit ihm kann die korrekte Lage der zu messenden Zellen eingestellt werden.

Die gesamte Messvorrichtung befindet sich auf einem aktiv schwingungsgedämpften Tisch (Kinetic Systems, Inc., Roslindale, MA, USA), um möglichst wenig Vibrationen weiterzugeben, die Relativbewegungen zwischen Zelle und Arbeitselektrode auslösen könnten. Umgeben wird die Messvorrichtung von einem Metallkäfig (Eigenbau aus Metall, Feinmechanikwerkstatt, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg, Marburg, Deutschland), der

2. Material und Methoden

elektromagnetische Störungen von Außen abschirmt. Dies ist dargestellt in Abbildung 11.

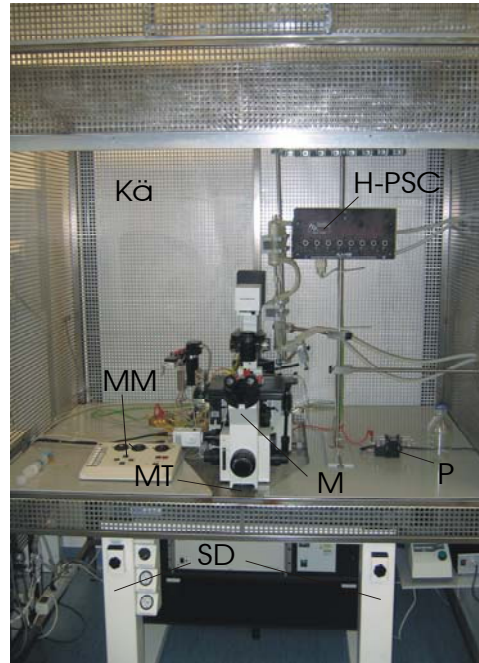


Abb. 11 Der Messstand. Der Messtisch (**MT**) mit dem Mikroskop (**M**) befindet sich auf schwingungsgedämpften Stützen (**SD**). Die gesamte Messvorrichtung ist von einem Käfig (**Kä**) umgeben, Oberhalb des Mikroskops befindet sich die Halterung für die Perfusionsschläuche (**H-PSC**), rechts die Pumpe (**P**) für die Absaugung und links das Steuerpult des Mikromanipulators (**MM**).

Wie Abbildung 12 zeigt, wurde anfangs zur Aufnahme der Messungen ein EPC9 Verstärker (EPC9, HEKA Electronics, Dr. Schulz GmbH, Lambrecht, Deutschland), später ein EPC10 Verstärker (EPC10, HEKA Electronics, Dr. Schulz GmbH, Lambrecht, Deutschland) verwendet. Die Messung selbst wurde mit dem Messprogramm Pulse (Pulse v8.63, HEKA Electronics, Dr. Schulz GmbH, Lambrecht, Deutschland) erhoben. Weitere Analysen wurden unter Zuhilfenahme des Tabellenkalkulationsprogramm Origin 7.0 vollführt.

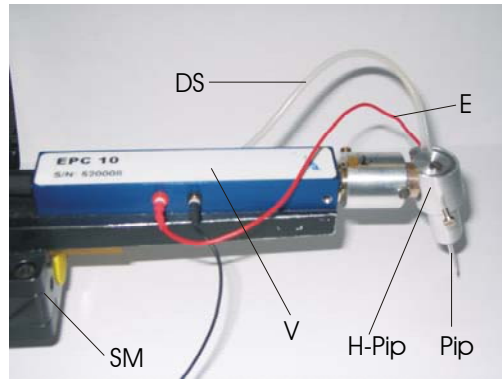


Abb. 12 Der EPC10 Verstärker. Die Darstellung zeigt den EPC10 Verstärker (**V**) mitsamt dem Pipettenhalter (**H-Pip**) mit eingespannter Patchpipette (**Pip**). Zum Pipettenhalter selbst führen einerseits die Erdung (**E**) und andererseits der Druckschlauch (**DS**), über den sowohl positiver als auch negativer Druck auf die Patchpipette und letztlich auf die Zelle ausgeübt wird. Zudem ist hier der Schrittmotor (**SM**) dargestellt, mit dem die Patchpipette in drei Ebenen bewegt werden kann.

2.2.1 Herstellung von Patchpipetten und deren Beschichtung

Verwendet wurden hierfür dünnwandige Borosilikatglaskapillaren (GB 150TF-8P, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland). Der Außendurchmesser betrug 1,50 mm, der Innendurchmesser 1,05 mm und die Länge 80 mm. Durch ein horizontales Pipettenziehgerät (DMZ-Universal-Puller, Zeitz Instrumente, München, Deutschland) wurden die Kapillaren in der Mitte erhitzt und schließlich auseinander gezogen. Das erstellte Pull-Programm bestand aus 2 Vorpulls und einem zweiphasigem Hauptpull, der die Glaskapillare schließlich auseinander zieht. Bei den konventionellen Ganzzellableitungen wurden Patchpipetten mit einem Widerstand von 2,5 bis 4,5 M Ω verwendet. Niedrigere Pipettenwiderstände erschwerten eine gute Sealbildung, d.h. die Bildung eines ausreichend hohen Abdichtwiderstands zwischen Patchpipette und Zellmembran. Dagegen wurden bei den Einzelkanalableitungen Patchpipetten zwischen 5 bis 12 M Ω benutzt. Patchpipetten unter 5 M Ω führten oftmals zu keiner erfolgreichen Messung. Mittels der des Pipettenziehgeräts eigenen Polierprogramme wurden die Spitzen der Patchpipetten durch erneutes kurzes Erhitzen feuerpoliert. Über Änderung des Parameters Delay Pull 1 tF(1) ließen sich hoch- oder niederohmige Patchpipetten herstellen. Dieser Parameter bezeichnet den Zeitraum vom Ende der ersten Phase bis zum Beginn der zweiten Phase des Hauptpulls. Aufgrund dieses Parameters Delay Pull

1 tF(1) wurden 2 Pullprogramme erstellt, mit denen sich für die jeweiligen Anforderungen schnell die erforderlichen Patchpipetten ziehen ließen.



Abb. 13 Pipettenziehgerät (DMZ Universal Puller). Dargestellt ist das Herstellen der Patchpipetten aus einer Glaskapillare (**GK**), die durch das Glühfilament (**GF**) des Pipettenziehgeräts („Puller“, **Pu**) in der Mitte erhitzt und dann auseinander gezogen wird, so dass zwei Patchpipetten entstehen.

Zur Verringerung der Pipettenkapazität wurden die Spitzen der Patchpipetten mit dem Elastomer R-6101 (Ellsworth Adhesive Systems, Bloomington, USA) beschichtet. Dieses Elastomer ersetzt das ebenfalls für diese Experimente benutzte Sylgard 184. Aufbewahrt wurde das Elastomer R-6101 bei -28°C . Unter einem Stereomikroskop (SZ-4045-CTV, Olympus, Hamburg, Deutschland) wurde R-6101 aufgetragen, indem man mittels handelsüblicher Insulinspritze einen Tropfen des R-6101 auftrug und zugleich die zu beschichtende Patchpipette drehte. Die so mit R-6101 beschichtete Spitze der Patchpipette wurde anschließend mittels Glühspirale ausgehärtet. Um nicht die Schmelztemperatur des Borosilikatglases zu erreichen, wurde die Pipettenspitze samt R-6101 für 10 s einer Temperatur von 150°C ausgesetzt. Das Auftragen des Elastomers R-6101 verkleinerte die elektrisch aufladbare Fläche und dadurch die Kapazität der Patchpipettenspitze um 2 – 3 pF. Eine nahezu symmetrische Verteilung des R-6101 war notwendig, da Asymmetrien der Beschichtungen zum Teil erhebliche Sichtbeeinträchtigungen beim Messvorgang hervorrufen konnten. Der Widerstand der Patchpipette änderte sich unter Verwendung von R-6101 nicht.

Nach Beschichtung der Patchpipettenspitze konnte die Patchpipette nun mittels eines Mikroloaders (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit der jeweiligen

Pipettenlösung gefüllt, in den Pipettenhalter eingespannt und zur Messung genutzt werden.

2.2.2 Badlösungen, Pipettenlösungen

Für die konventionellen Ganzzellaufleitungen wurden folgende Lösungen benutzt:

Als Pipettenlösung wurde eine Lösung mit folgender Zusammensetzung verwendet:

120 mM CsCl, 3,949 mM CaCl₂ x 2H₂O, 10 mM HEPES, gepuffert auf 100 nM freies Ca²⁺ mit 10 mM BAPTA, 1 mM MgCl₂ x 6H₂O, 0,3 mM Na₃-GTP, 9,4 mM NaCl. Die Titration erfolgte mit 5 M CsOH. Der pH-Wert betrug 7,20, die Osmolarität 297 mOsm kg⁻¹.

Die verwendete Badlösung war folgendermaßen zusammengesetzt:

140 mM NaCl, 5 mM CsCl, 2 mM CaCl₂ x H₂O, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, 1 mM MgCl₂ x 6 H₂O. Die Titration erfolgte mit NaOH. Der pH-Wert wurde auf 7,40 eingestellt. Die Osmolarität besaß Werte zwischen 291 und 299 mOsm kg⁻¹.

Hingegen waren für die Einzelkanalaufleitung Lösungen anderer Zusammensetzung notwendig. Als Pipettenlösung wurde eine Lösung mit folgenden Bestandteilen verwendet:

120 mM CsCl, 3,949 mM CaCl₂ x 2H₂O, 10 mM HEPES, gepuffert auf 100 nM freies Ca²⁺ mit 10 mM BAPTA, 1 mM MgCl₂ x 6H₂O, 10 mM NaCl. Die Titration erfolgte mit 5 CsOH. Der pH-Wert betrug 7,20, die Osmolarität 306 mOsm kg⁻¹.

Als Badlösung diente die schon bei den Ganzzellaufleitung benutzte Lösung, zudem auch eine weitere, die folgende Bestandteile enthielt:

120 mM CsCl, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ x 6H₂O, gepuffert auf 100 nM freies Ca²⁺ mit 10 mM EGTA, 4,955 mM CaCl₂ x 2H₂O. Die Titration erfolgte mit CsOH auf den pH-Wert 7,20. Die Osmolarität betrug 305 mOsm kg⁻¹. Zur Stimulation der HEK293 Zellen wurde in den Ganzzellaufleitungen ein Agonist in maximaler Wirkkonzentration (100 µM Histamin oder 100 µM Carbachol) zur Badlösung hinzu gegeben. Bei Einzelkanalaufleitungen verwendete man hingegen 1 µM des in DMSO gelösten, nicht Membran-permeablen DAG-Analogons SAG (1-Stearoyl-2-arachidonyl *sn*-glycerol, Calbiochem, San Diego, USA) verwendet. Vor Applikation wurde SAG 7 min im Ultraschallbad behandelt, um eine Mizellenbildung zu verhindern.



Abb. 14 Herstellung der Lösungen. Mit dem dargestellten pH-Meter (**PH**) wurde der pH-Wert der betreffenden Lösung (**Lsg.**) ermittelt und gegebenenfalls geändert. Nach Einstellung des richtigen pH-Wertes wurde mittels Osmometer (**O**) die Osmolarität der Lösung bestimmt.

2.3 Offsetpotential

Das Offsetpotential ist ein Potential, das an den Übergängen innerhalb der Messkette Silberdraht-Pipettenlösung-Badlösung-Referenzelektrode zustande kommt. So kann man nach dem Eintauchen der Patchpipettenspitze in die Badlösung selbst bei 0 mV applizierter Spannung einen Stromfluss registrieren. Um nur den von den Kanälen erzeugten Strom zu erhalten, musste dieses Offsetpotential ausgeglichen werden. Zum Ausgleich dieses Potentials wurde die Patchpipette ca. 1 – 2 μm oberhalb der zu untersuchenden HEK293 Zelle gefahren und dann ein Potential definiert, bei dem kein Strom zwischen der Patchpipette und der Referenzelektrode fließt. Dieses Potential wird deshalb auch Nullpotential und der gesamte Vorgang Nullpunkteinstellung genannt.

Dieses Potential wurde bei den verwendeten EPC9 und EPC10 Verstärkern durch Aktivierung der Offset-Routine vom Pulse-Programm gesucht und eingestellt. Der Ausgleich des Offsets kann aber nicht das Liquid Junction Potential ausgleichen, was separat geschehen muss.

2.3.1 Liquid Junction Potential

Treten zwei Lösungen unterschiedlicher Ionenkonzentration miteinander in Kontakt, dann sind sie bestrebt, diesen Unterschied an Ionenkonzentration auszugleichen. Die

daraus resultierende Spannung ist das Liquid Junction Potential, welches auch zwischen der Pipetten- und der Badlösung vorliegt (Barry & Lynch, 1991). Das Liquid Junction Potential wurde mit dem Programm „Clampex“ bestimmt. Unter Angabe aller Ingredienzien der jeweils miteinander verwendeten Bad- und Pipettenlösung bestimmte das Programm das in diesem Fall vorliegende Liquid Junction Potential. Es ist verständlich, dass für alle verwendeten Kombinationen von Bad- und Pipettenlösungen das jeweilige Liquid Junction Potential bestimmt werden muss. Der ermittelte Wert wird dann in die dafür vorgesehene Spalte des Messprogramms „Pulse“ eingegeben. Das Messprogramm ist dann in der Lage, Messungen unter Berücksichtigung dieses Liquid Junction Potentials zu erheben, ohne dass eine erneute Korrektur desselben erfolgen muss. So betrug das Liquid Junction Potential bei Verwendung der Pipetten- und Badlösung in den Ganzzellaufleitungen 4,3 mV. Dagegen belief sich das Liquid Junction Potential der jeweiligen Pipetten- und Badlösung in den Einzelkanalaufleitungen auf 4,2 mV.

2.3.2 Mikromanipulator

Für die Bewegungen der Patchpipette wurde ein Mikromanipulator (LN mini/combi, Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) verwendet. Dieser verfügt über einen Schrittmotor, der sich automatisch sowohl mittels Tastenbetrieb als auch über ein Handrad bewegen lässt. Im Tastenbetrieb lassen sich 2 Bewegungsgeschwindigkeiten einstellen. In der Einstellung „Speed“ beträgt die Geschwindigkeit 6 mm/s, in der Geschwindigkeit „Slow“ dagegen nur 0,24 mm/s. Die Einstellung „Speed“ erlaubt nur eine grobe Ausrichtung der Patchpipette. Dagegen erlaubt die Einstellung „Slow“ ein sicheres Heranführen der Patchpipette an die zu untersuchende HEK293 Zelle. Mittels Handrad sind feinere Bewegungen möglich, so dass die Patchpipette sicher auf die Zelloberfläche gesetzt werden kann. Die Größe der vorgenommenen Bewegungen lässt sich anhand des Handrads bestimmen. Eine Umdrehung umfasst 400 Mikroschritte, was 40 μm entspricht. Die kleinste mögliche Schrittweite beträgt demzufolge 100 nm.

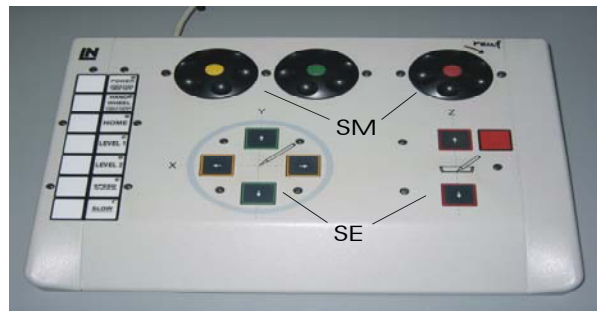


Abb. 15 Steuerpult des Mikromanipulator. Mittels des Mikromanipulators wurde die Patchpipette und damit die Messelektrode sowohl in vertikaler als auch in horizontaler Ebene bewegt. Dabei verfügt der Mikromanipulator auf der einen Seite über eine Tastensteuerung – hier elektrische Steuerung (**SE**) genannt - für schnelle Bewegungen und grobe Einstellungen und auf der anderen Seite über eine Steuerung mittels Handrad - hier manuelle Steuerung (**SM**) genannt -, die für die nachfolgende Feineinstellung von Patchpipette und Messelektrode nötig ist.

Der Mikromanipulator wurde direkt an den Objektstisch befestigt, um Relativbewegungen zwischen Patchpipettenspitze und Mikromanipulator zu unterbinden, da sich anfallende störende Bewegungen nun gleichmäßig auf beide, Patchpipettenspitze und Mikromanipulator, auswirkten. Aus ebendiesen Gründen wurde auch der EPC9 bzw. EPC10 Verstärker auf den Arm des Mikromanipulators befestigt.

2.3.3 Referenzelektrode

Wie Abbildung 16 erläutert, wurden vorgefertigte gesinterte Silber-Silberchlorid-Elektroden verwendet (EP05, WPI, Sarasota, USA). Das blanke Ende der Referenzelektrode wurde mit einem vergoldeten Adapterstift (isolierter Lötstützpunkt: „MikroPAT“, TWK-Elektronik, Düsseldorf, Deutschland) verbunden. Diese Verbindung wurde mit einem 0,5 cm langen Polyethylen-Schlauch (MED-PE-Mikroschlauch 28479, 1,52 mm x 0,86 mm x 50 mm, Reichelt, Heidelberg, Deutschland) isoliert. Das beschichtete Ende des Silberdrahtes ragte noch ca. 1,5 cm über die Isolierungshülle eines Kupferdrahtes hinaus und wurde mit Klarlack besprüht.

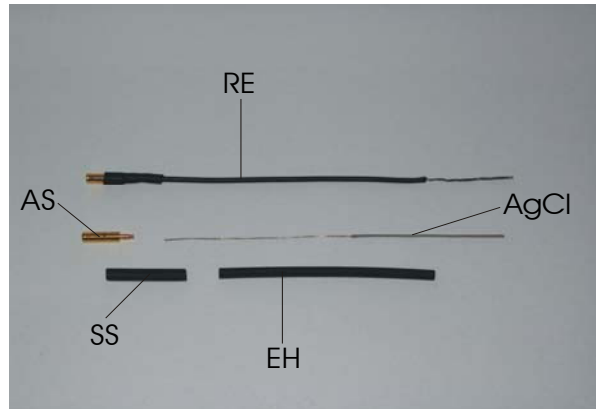


Abb. 16 Die Elemente der Referenzelektrode. Wie die Darstellung zeigt, besteht die Referenzelektrode (RE) aus verschiedenen Bestandteilen. Grundlegendes Element ist die Silber-Silberchlorid-Elektrode (AgCl). Am anderen Ende wird die Silber-Silberchlorid-Elektrode mit einem Adapterstift (AS) versehen, mittels diesem sie dann an den EPC10 Verstärker angeschlossen wird. Für den festen Sitz des Adapterstiftes wird der Schrumpfschlauch (SS) über Adapterstift und Silberdraht angebracht. Der gesamte Silberdraht wird abschließend außer seinem chlorierten Ende mit einer Elektrodenhülle (EH) versehen.

2.3.4 Pipettenhalter

Die Patchpipette musste für den Messvorgang sicher und stabil fixiert sein. Außerdem musste die Verbindung zum Verstärker sichergestellt und weiterhin das Erzeugen eines Über- und Unterdruckes möglich sein. Gerade beim Wechsel vom Über- zum Unterdruck durfte es keinen Raum für mechanisches Spiel geben, da sonst eine erfolgreiche Messung behindert werden konnte. Deshalb wurde ein Pipettenhalter (Eigenbau aus Polycarbonat, Feinmechanikwerkstatt, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg, Marburg, Deutschland) verwendet. Um die Störsignale möglichst gering zu halten, wurde ferner eine weitere Abschirmung (Eigenbau aus Aluminium, Feinmechanikwerkstatt, Institut der Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg, Marburg, Deutschland) angebracht, die über den gesamten Pipettenhalter gezogen wurde. Diese Abschirmung reduzierte die Störsignale und erniedrigte das elektrische Rauschen auf bis zu 200 fA r.m.s., was vor allem bei den Einzelkanalableitungen von Vorteil war.

Bei Einzelkanalableitungen verwendete man eine besonders lange Abschirmung, die nicht nur den gesamten Pipettenhalter, sondern auch einen Teil der Patchpipette selbst abdeckte. Die optimale Länge dieser Abschirmung wurde im

praktischen Versuch bestimmt, so dass sie den eigentlichen Messvorgang nicht beeinflusste.

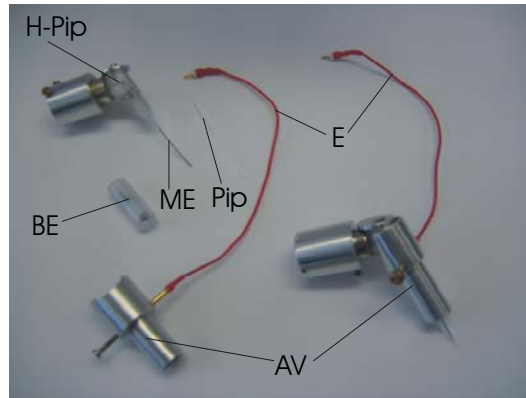


Abb. 17 Die Elemente des Pipettenhalters. Im Pipettenhalter (**H-Pip**) ist die Ableitelektrode oder Messelektrode (**ME**) integriert. Über die Ableitelektrode wird die Patchpipette (**Pip**) platziert, die dann mittels eines Befestigungselementes (**BE**) fixiert wird. Um die Messelektrode möglichst wenigen Störungen auszusetzen, wird über den gesamten Pipettenhalter eine Aluminiumverkleidung (**AV**) geschoben, an der die Erdung (**E**) befestigt ist.

2.3.5 Perfusionssystem

Das Perfusionssystem wurde selbst konstruiert. Für die verschiedenen Badlösungen wurden handelsübliche 50 ml Perfusorspritzen (Original Perfusor Spritzen, Braun, Homberg/Efze, Deutschland) verwendet. Die Spritzenausgänge, die sich ca. 50 cm über den Niveau der Messkammer befanden, waren über Silikonschläuche ($\varnothing_i = 1,6$ mm; Tygon) mit der Messkammer über ein gemeinsames Endstück verbunden, dargestellt in Abbildung 18. Die Länge dieses auch als Reduzierstück bezeichneten PVC-Schlauchs (Reichelt, Sande, Deutschland) beeinflusste maßgeblich die Flussgeschwindigkeit. Der Innendurchmesser dieses PVC-Schlauch betrug ca. 0,25 mm, die Länge etwa 14 cm. Diese Abmessungen ließen eine Perfusionsrate von 1015 $\mu\text{l}/\text{min}$ zu. Die Anordnung und die Charakteristik der Schläuche garantierten einen völligen Austausch der verschiedenen Badlösungen in ca. 1 – 2 s mit einer Latenz von maximal 15 s.

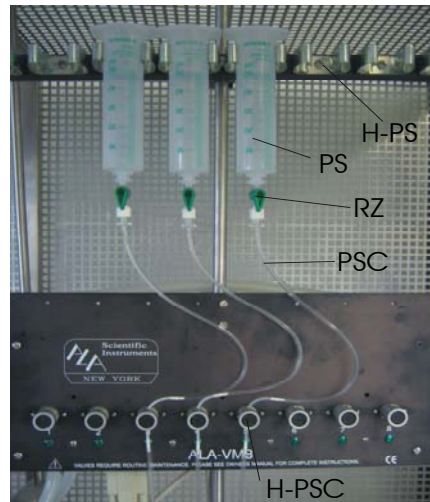


Abb. 18 Perfusionssystem. Das Perfusionssystem besteht aus einzelnen Perfusorspritzen (PS), die in einer Halterung befestigt werden (H-PS). An die Perfusorspritze schließt sich zuerst ein Hahn zur Regelung des Zuflusses (RZ) an, danach der Perfusionsschlauch (PSC), der in einer Halterung (H-PSC) angebracht ist.

Die Absaugung der Badlösungen erfolgte über eine rechtwinklig gebogene Glaskapillare (GB 150TF-8P, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland). Diese Glaskapillaren fanden auch als Patchpipetten Verwendung. Sie wurden mittels Bunsenbrenner im oberen Drittel erhitzt, in die erwünschte, rechtwinklige Form gebracht und an eine Peristaltikpumpe (12 V, Eigenbau, Feinmechanikwerkstatt, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg, Marburg, Deutschland) angeschlossen. Abbildung 19 erläutert diesen Aufbau. Die Geschwindigkeit der Pumpe gewährleistete, dass Zu- und Abfluss sich die Waage hielten. Zudem durfte die zugeleitete Badlösung nur in kleinen Portionen abgesaugt werden. Dies verhinderte eine zusammenhängende Flüssigkeitssäule im Schlauch, die als Antenne wirken konnte.

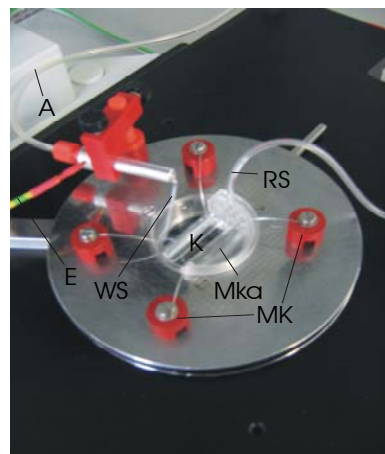


Abb. 19 Die Absaugvorrichtung. Über das Perfusionssystem wird die Lösung zunächst durch einen Reduzierschlauch (**RS**) geleitet, bevor sie den Kanal (**K**) der Messkammer (**Mka**) erreicht, der den zu messenden Bereich abgrenzt. Die Messkammer selbst wird durch Metallklammern (**MK**) in ihrer Position gehalten. Die Lösung läuft in ihrem weiteren Verlauf durch den Kanal und wird anschließend durch eine als Winkelstück (**WS**) fungierende rechtwinklig gebogene Glaskapillare abgesaugt. An dieses Winkelstück schließt sich der Absaugschlauch (**A**) an. Die gesamte Absaugvorrichtung selbst wird an die Erdung (**E**) angeschlossen.

2.3.6 Messkammer

Die Messkammer (Eigenbau aus Plexiglas oder Acrylglas, Feinmechanikwerkstatt, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Marburg, Marburg, Deutschland) wurde aus Plexiglas oder Acrylglas gefertigt, wobei ihre Abmessungen dem 33 mm Kulturschälchen angepasst wurden. In der Mitte der Messkammer wurde ein Kanal (20 mm x 4 mm x 1,5 mm) angelegt, in dem sich die jeweilige Badlösung verteilen konnte. Der Fluss der Badlösungen war hier annähernd laminar, eine unverzichtbare Voraussetzung für gute Messungen, da Turbulenzen Zellbewegungen auslösen und einen Wechsel der Lösungen erschweren konnten. Der Zufluss der Badlösungen erfolgte über das eine Ende der Messkammer, an dem der Zuführungsschlauch befestigt ist. Hier ist auch direkt vor dem Zuführungsschlauch die Referenzelektrode positioniert. Sowohl für den Zuführungsschlauch als auch für die Referenzelektrode befanden sich an diesem Ende zwei vertikale Bohrungen. Das andere Ende des Kanals war geöffnet, so dass die jeweilige Badlösung den Kanal verlassen und zur Absaugvorrichtung gelangen konnte. Oberhalb der Messkammer befanden sich Rundfräsungen, damit keine Tropfen hängen bleiben konnten.

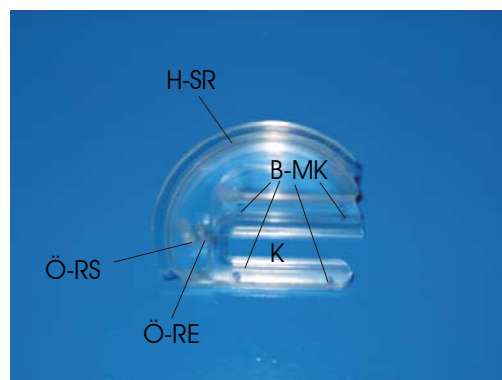


Abb. 20 Die Messkammer. Die wichtigste Komponente der Messkammer ist der Kanal (**K**), in dem sich die Badlösung laminar fließend verteilt. Die Messkammer ist in ihren Abmessungen dem 33 mm Kulturschälchen angepasst und besitzt einen ausgezogenen Rand, der sich über den Schälchenrand

stülpt und als Halterung (**H-SR**) dient. Um keine weiteren Bewegungen der Messkammer zuzulassen, besitzt sie vier Bohrungen für die Metallklammern (**B-MK**). Oberhalb des Kanals liegen zwei vertikale Bohrungen. Die erste dient als Öffnung für den Reduzierschlauch (**Ö-RS**), die zweite als Öffnung für die Referenzelektrode (**Ö-RE**).

2.4 Pipettenkapazität

Um die Membrankapazität genau zu bestimmen, muss die Kapazität der Patchpipette kompensiert werden. Dies geschah während der Messungen in der Cell-attached-Konfiguration, bei der die Zellmembran unterhalb der Patchpipette hinein gesogen und dabei ein elektrischer Abdichtwiderstand („Seal“) etabliert wurde. Die Stromtransienten infolge einer Rechteckspannung (± 5 mV, Pulsdauer 10 ms) wurden hierbei minimiert. Dies konnte sowohl beim EPC9 als auch beim EPC10 Verstärker durch die Funktion „C-Fast“ durchgeführt werden.

2.4.1 Membrankapazitätsbestimmung

Bei angelegter Spannung wird von der Membran selbst eine bestimmte Ladungsmenge gespeichert. Dies wird als Kapazität bezeichnet, bei der jeweils untersuchten Membran als Membrankapazität. Um eine erfolgreiche Messung durchzuführen, muss die Membrankapazität bestimmt und berücksichtigt werden. EPC9 und EPC10 Verstärker können mittels der Funktion „C-Slow“ die jeweilige Membrankapazität bestimmen und kompensieren.

2.5 Zellkultur

Für die Experimente wurden HEK293 Zellen - eine Zelllinie aus menschlichen embryonalen Nierenzellen („human embryonic kidney cells“) - verwendet. Diese Zelllinie wurde im Brutschrank (HERAcell, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland) bei 37°C und 5%iger CO₂ Konzentration in 250 ml Kulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) als Monolayer, d.h. als einschichtiger Zellrasen kultiviert. Als Nährmedium verwendete man das Earle's minimale essentielle Medium (EMEM Earle, PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria). Zur Förderung schnelleren Wachstums setzte man 10% fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS, PAA Laboratories, Linz, Austria), zum Schutz vor grampositiven bzw.

gramnegativen Keimen 50 U ml^{-1} Pencillin und 50 U ml^{-1} Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria) hinzu. Bei ausreichender Konfluenz (mindestens 80% des Flaschenbodens waren bedeckt) wurden die adhärennten Zellen durch 0,02%igen EDTA-haltige 0,05%ige Trypsinlösung (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria) vom Flaschenboden abgelöst und in der Verdünnung 1:10 sowie 1:20 auf zwei weitere 250 ml Kulturflaschen verteilt. Vorher wurde mit Dulbecco's Phosphat-gepufferter Salzlösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria) Calcium gebunden, da Calcium die Funktion von Trypsin einschränkt. Die Transfektionen wurden in 33 mm Kulturschälchen – im Weiteren NUNC-Schälchen (Nunc Brand Products, Nalge Nunc International, Dänemark) genannt – mit zwei Tage zuvor ausgesäten 300000 HEK293 Zellen durchgeführt. Für elektrophysiologische Untersuchungen wurden die transfizierten HEK293 Zellen mittels 0,02%igen EDTA-haltiger 0,05%ige Trypsinlösung vom Boden der 33 mm NUNC-Schälchen abgelöst und durch An- und Absaugen über eine blauen Pipettenspitze vereinzelt. Je nach Zelldichte wurde die Zellsuspension auf bis zu 10 NUNC-Schälchen verteilt. Nach frühestens einer Stunde konnten die HEK293 Zellen untersucht werden.

2.5.1 Transfektion

Die HEK293 Zellen wurden vor dem jeweiligen Experiment mit der pcDNA (Plasmid cDNA) der zu messenden Kanal-Proteinen transfiziert, wobei als Transfektionsreagenz Fugene6[®] (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) Verwendung fand. Fugene6[®] ist eine Suspension liposomal vorliegender Lipide. In einem 1,5 ml großen Reaktionsgefäß, Cup (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) genannt, wurde das jeweilige pcDNA-Konstrukt (in μg) mit 100 μl FCS freiem Nährmedium sowie der dreifachen Menge des Transfektionsreagenzes (in μg) nach Angaben des Herstellers versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurde das Gemisch aus pcDNA, serumfreien Nährmedium und Transfektionsreagenz auf die HEK293-Zellen gegeben. Die eingesetzten pcDNA-Mengen betrugen bei HEK293 Zellen in der Regel 2 μg Kanal-pcDNA, 0,5 μg Rezeptor-pcDNA und 0,1 μg pEGFP („enhanced green fluorescens protein“, Invitrogen, San Diego, USA). pEGFP kodiert für fluoreszierende Proteine. Es handelt sich hierbei um eine Abwandlung eines fluoreszierenden Proteins der Qualle *Aequorea victoria*. Die Kotransfektion mit pEGFP

diente zur Identifizierung von transfizierten HEK293 Zellen mittels der Fluoreszenzmikroskopie. Die pcDNA-Konstrukte folgender Kanal-Proteine wurden verwendet: hTRPC6 (Human Transient Receptor Potential Channel 6), hTRPC3 (Human Transient Receptor Potential Channel 3), hTRPC7 (Human Transient Receptor Potential Channel 7) und deren Glykolyserungsmutanten hTRPC6-N473Q, hTRPC6-N561Q, hTRPC6-N473Q-N561Q und TRPC3-E512N. Die pcDNA-Konstrukte der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren waren: Histamin- H_1 -Rezeptor aus dem Meerschweinchen (gpH₁R) und muskarinischer M₅-Rezeptor aus der Ratte (rM₅R). Für die Wildtyp-Kanal-Proteine war eine Transfektionszeit von 24 bis 48 h, für die Glycosylierungsmutanten 48 bis 72 h notwendig.

2.5.2 Messvorbereitungen

Nach Transfektion wurden die HEK293 Zellen durch An- und Absaugen mittels blauer Pipettenspitze mechanisch vereinzelt und zu 300000 auf mit 1,5 ml Nährmedium gefüllte NUNC-Schälchen verteilt. Nach etwa 1 h konnten die Zellen gemessen werden. Diese Zeitspanne gewährleistete, dass die Zellen mit der Lamininbeschichtung der NUNC-Schälchen fest verwachsen waren und dadurch nicht von der zugeleiteten Badlösung weggeschwemmt werden konnten. Unterhalb dieser Zeitspanne war ein sicheres Verwachsen der Zellen mit der Lamininbeschichtung der NUNC-Schälchen nicht gegeben, die Messung gefährdet.

2.5.3 Sealbildung (Cell-attached-Konfiguration)

Um eine Messung durchzuführen, musste die Spitze der Patchpipette an die Zellmembran herangeführt werden. Verschmutzungen der Patchpipettenspitze während des Eintauchens in die Badlösung wurden durch einen auf die Patchpipette angelegten Überdruck von ca. 10 cm Wassersäule verhindert. Das Heranführen der Patchpipette geschah unter Sichtkontrolle mittels einer CCD-Kamera (KAM02E, EHD, Damme, Deutschland), die Bewegungen bei einer 600fachen Gesamtvergrößerung verfolgte. Die letzten Mikrometer bis zur Zelle wurde in der Spannungsklemm-Konfiguration (Rechtecksprung von ± 5 mV, Pulsdauer 10 ms) überwacht. Eine Verkleinerung der Stromamplitude um etwa 50 – 75% zeigte einen ausreichenden Abstand an. Durch Wegnahme des Überdrucks berührte die Patchpipette schließlich die Zellmembran.

Durch vorsichtigen Unterdruck wurde die unterhalb der Patchpipette liegende Zellmembran in diese hinein gezogen und ein elektrischer Abdichtwiderstand („Seal“) etabliert, der in den meisten Fällen mehrere Gigaohm betrug.

2.5.4 Ganzzellkonfiguration (Whole-Cell-Konfiguration)

Für die Ganzzellkonfiguration sind hohe Abdichtwiderstände von mindestens 2 – 4 G Ω notwendig, deren Etablierung oben erläutert wurde. Anschließend wurde der Pipettenwiderstand durch die Funktion „C-Fast“ des EPC9 und EPC10 Verstärkers kompensiert. Als Haltepotential diente –60 mV, ein Wert, der hinsichtlich des intrazellulären Potentials von ca. 60 – 80 mV am besten geeignet schien. Der unterhalb der Patchpipettenspitze liegende Anteil der Zellmembran wird allgemein als „Patch“ („Membranfleck“) bezeichnet. Durch vorsichtiges Ansaugen wurde zunächst ein ausreichender Abdichtwiderstand etabliert. Durch weiteres Ansaugen riss man den Patch schließlich auf. Die Zelle war an dieser Stelle geöffnet, die Ganzzellkonfiguration damit herbeigeführt.

2.5.5 Einzelkanalkonfiguration (Single-Channel-Konfiguration)

Die Einzelkanalkonfiguration stellte sich in vielen Belangen als komplizierteres und anspruchsvolleres Verfahren heraus. Unterteilt wurde es in die „inside-out“- und die „outside-out“-Konfiguration, die im Folgenden beschrieben werden. Für die Einzelkanalkonfiguration sind sehr hohe Abdichtwiderstände von mindestens 5 G Ω unabdingbar, damit Leckströme und elektrisches Rauschen möglichst minimiert werden. Anders als bei der Ganzzellkonfiguration wird hier der Patch nicht auf-, sondern aus der Zellmembran gerissen. Dazu mussten die NUNC-Schälchen zusätzlich mit Polylysin beschichtet werden, wodurch die Zellen fester mit dem Boden verwachsen konnten. Ohne die Zellen vom Boden zu lösen, konnte der Patch nun herausgerissen werden.

Im Folgenden wird die „inside-out“-Konfiguration beschrieben, deren Ergebnisse in dieser Arbeit Verwendung fanden:

Nach Herstellung eines geeigneten Abdichtwiderstands, nach Ausgleich der Pipettenkapazität und nach Anlegen einer Spannung von 0 mV wurde die Patchpipette

einige Mikrometer nach oben bewegt, bis der Patch aus der Zellmembran herausgerissen wurde. Änderte sich der Abdichtwiderstand nicht oder nur gering, war der Patch erfolgreich herausgerissen worden. Die Messung konnte nun unter Verwendung der jeweiligen Bad- und Pipettenlösungen ohne bzw. mit Applikation von SAG erfolgen.

Abschließend sei die „outside-out“-Konfiguration kurz erläutert:

Analog zur inside-out-Konfiguration wurde zunächst ein ausreichender Abdichtwiderstand hergestellt, der Pipettenwiderstand ausgeglichen und eine Spannung von 0 mV angelegt. Durch Unterdruck wurde der Patch anschließend aufgerissen und die Ganzzellkonfiguration etabliert. Anschließend wurde die Patchpipette mehrere Mikrometer nach oben bewegt und der aufgerissene Patch herausgerissen. Änderte sich der Abdichtwiderstand nicht oder nur gering, war auch hier der Patch erfolgreich herausgerissen worden.

2.6 Statistik

Die erhobenen Daten wurden, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwerte und deren Standardfehler (S.E.M., „standard error of the mean“) dargestellt. Zwischen zwei Datensätzen diente als Signifikanztest der gepaarte oder ungepaarte Student's *t*-Test. Die Signifikanz wurde bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ akzeptiert und jeweils in der vorliegenden Arbeit angegeben. Zum Vergleich mehrerer Datensätze wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, „one-way analysis of variance“) mit dem Mittelwertvergleich nach Scheffé angewendet.

3. Ergebnisse

Da die Kanal-Proteine hTRPC3, hTRPC6 und hTRPC7 jeweils durch DAG aktiviert werden und mit sich selbst *homotetramere* oder untereinander *heterotetramere* funktionelle Kationen-Kanäle bilden, war unklar, ob sie funktionell redundant sind oder unterschiedliche zelluläre Aufgaben besitzen. Die Wildtyp-Kanal-Proteine hTRPC3, hTRPC6 und m(Maus)TRPC7 wurden in vorliegender Arbeit biophysikalisch analysiert. Aufgrund der Ergebnisse sind die Wildtyp-Kanal-Proteine keineswegs funktionell redundant, sondern weisen unterschiedliche biophysikalische Eigenschaften auf. Als nächster Schritt sollte die Ursache dieser unterschiedlichen biophysikalischen Eigenschaften eruiert werden. Aufgabe dieser Arbeit war es festzustellen, ob und inwiefern die biophysikalischen Eigenschaften der Wildtyp-Kanal-Proteine hTRPC3 und hTRPC6 sowie deren Glykosylierungsmutanten hTRPC3-E512N, hTRPC6-N561Q und hTRPC6-N467Q-N512Q vom jeweiligen Glykosylierungsmuster bestimmt werden. mTRPC7 wird nur hinsichtlich seiner biophysikalischen Eigenschaften vorgestellt. Es spielt bei der weiteren Betrachtung keine Rolle.

Folgende biophysikalische Eigenschaften wurden in der Ganzzellkonfiguration untersucht: Stromdichte, konstitutive Aktivität, hier Basalaktivität genannt, Stromantwort nach Aktivierung durch die Agonisten Histamin oder Carbachol in maximaler Wirkkonzentration (100 μ M Histamin bzw. 100 μ M Carbachol) sowie Stromantwort nach erfolgter Inaktivierung. Die Stromdichte ist definiert als Stromstärke pro durchflossener Querschnittsfläche. Übertragen auf die Zellmembran ist die Stromdichte das Verhältnis der Stromstärke aktiver funktioneller Kanäle zur Kapazität der untersuchten Membranfläche. Für die Stromdichte gilt die Beziehung der Stromstärke I zur Membrankapazität C_M (Einheit: pA/pF). Die Basalaktivität ist die konstitutive Aktivität der funktionellen Kanäle vor Rezeptor-Aktivierung. Die Stromdichte wurde bei den Haltepotentialen von ± 60 mV ermittelt. Zur Bestimmung der prozentualen Basalaktivität wurde die maximale Stromantwort bei ± 60 mV unter Rezeptorstimulation auf 100% gesetzt. Die Stromdichten und die prozentuale Basalaktivität sind als Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwertes dargestellt. Die Spannungsbeziehung vor, während und nach Rezeptorstimulation wurden durch Spannungsrampen von -100 mV bis +60 mV bei einer Frequenz von 1 Hz mit einem Anstieg von 40 mVs⁻¹ bestimmt und bei einer Frequenz von 1,67 kHz

gefiltert. Alle Stromantworten vor, während und nach erfolgter Rezeptorstimulation wurden zusammenfassend auf einer Stromantwort-Zeit-Achse als Stromverlauf dargestellt. Zusätzlich wurde das Umkehrpotential der Kationen-Kanäle bestimmt. Am Umkehrpotential heben sich der Einwärts- und Auswärtsstrom auf. Der Nettostrom ist gleich Null. Dieses Umkehrpotential ist ein Kennzeichen für die Ionenselektivität eines Kanals, seine Verlagerung eine Änderung derselben.

3.1 Kanäle ohne Veränderungen der Glykosylierungsstruktur

hTRPC3, hTRPC6 und hTRPC7 bilden die hTRPC3,6,7-Subfamilie. Sie besitzen insgesamt sieben potentielle Glykosylierungsstellen, von denen zwei extrazellulär liegen und später genauer erläutert werden. Die jeweiligen Wildtyp-Kanal-Proteine werden im Folgenden hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften analysiert und anschließend miteinander verglichen. Die Glykosylierungsmutanten werden anschließend analysiert.

3.1.1 Stromdichte und Basalaktivität von hTRPC3 sowie hTRPC6

Zunächst wurde die Stromdichte der hTRPC3- und hTRPC6-Kationen-Kanäle ermittelt, indem die hTRPC3- und hTRPC6-Kanal-Protein exprimierende HEK293 Zellen in der Ganzzellkonfiguration bei einem Haltepotential von ± 60 mV ohne Aktivierung durch Histamin (100 μ M Histamin) gemessen wurden. Wie Abbildung 21 zeigt, verfügten die hTRPC6-Kationen-Kanäle nur über eine geringe Stromdichte. Bei einem Haltepotential von +60 mV betrug die Auswärtsstromdichte ca. $4,5 \pm 1,0$ pA/pF, die Einwärtsstromdichte bei einem Haltepotential von -60 mV etwa $2,5 \pm 0,8$ pA/pF. Abbildung 22 zeigt hingegen die Stromdichte der hTRPC3-Kationen-Kanäle. Bei einem Haltepotential von +60 mV wies die Auswärtsstromdichte $30,5 \pm 7,0$ pA/pF auf. Die Einwärtsstromdichte betrug hingegen bei -60 mV etwa $9,8 \pm 6,0$ pA/pF. Beim direkten Vergleich zwischen hTRPC6 und hTRPC3 weist die Auswärtsstromdichte der hTRPC3-Kationen-Kanäle einen ca. 6fach, die Einwärtsstromdichte einen ca. 5fach höheren Wert auf. Die hTRPC3-Kanal-Proteine bilden demzufolge Kationen-Kanäle, die eine viel größere Stromdichte erzeugen als die Kationen-Kanäle der hTRPC6-Kanal-Proteine.

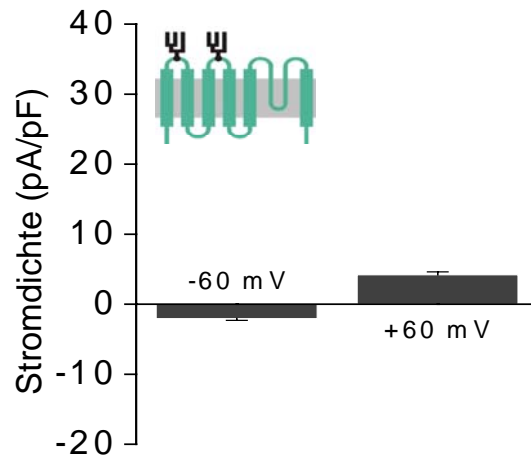


Abb. 21 Stromdichte von hTRPC6. Dargestellt ist die Einwärtsstromdichte bei einem Haltepotential von -60 mV und die Auswärtsstromdichte bei einem Haltepotential von $+60$ mV vor Applikation von Histamin. Die Ergebnisse von 16 die hTRPC6-Kanal-Proteine exprimierenden HEK293 Zellen gingen in diese Abbildung ein. Angaben als Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwertes. Zudem ist das Glykosylierungsmuster schematisch dargestellt. Das hTRPC6-Kanal-Protein besitzt zwei Glykosylierungsstrukturen.

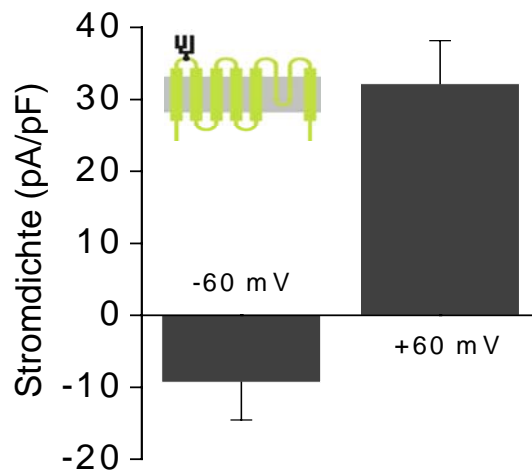


Abb. 22 Stromdichte von hTRPC3. Dargestellt ist die Einwärtsstromdichte der hTRPC3-Kationen-Kanäle bei einem Haltepotential von -60 mV sowie die Auswärtsstromdichte bei einem Haltepotential von $+60$ mV. Angaben als Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwertes. Insgesamt gingen die Messungen von 11 die hTRPC3-Kanal-Proteine exprimierende HEK293 Zellen in die Abbildung ein. Ferner ist die schematische Darstellung des Glykosylierungsmusters zu erkennen. Das hTRPC3-Kanal-Protein besitzt eine Glykosylierungsstruktur.

Abbildung 23 zeigt die Basalaktivität der hTRPC6-Kationen-Kanäle. Bei einem Haltepotential von $+60$ mV und -60 mV verfügen die hTRPC6-Kationen-Kanäle nur über eine geringe Basalaktivität, die hier als prozentualer Anteil der maximalen

3. Ergebnisse

Stromantwort nach Rezeptorstimulation (normiert als 100%) dargestellt wurde. Nach Rezeptorstimulation wiesen die durch die hTRPC6-Kanal-Proteine gebildeten Kationen-Kanäle maximale Stromantworten. Die hTRPC6-Kationen-Kanäle verfügen also über eine geringe konstitutive Aktivität. Ihre Aktivierung muss einer engen Regulation unterworfen sein.

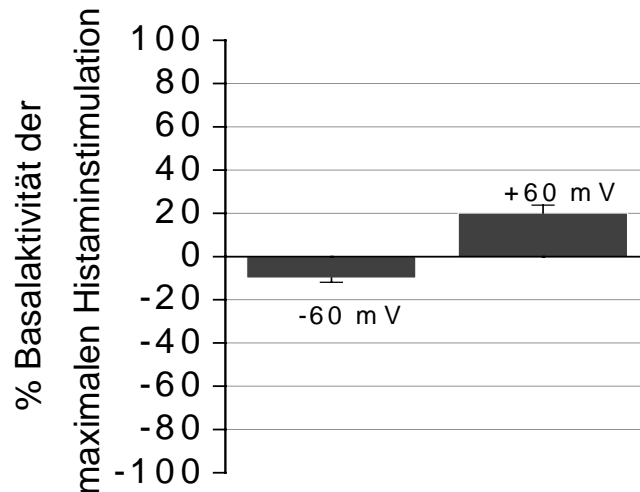


Abb. 23 Basalaktivität von hTRPC6. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Basalaktivität der hTRPC6-Kationen-Kanäle an der maximalen Stromantwort (auf 100% normiert) bei Haltepotentialen von ± 60 mV. Die Ergebnisse von 14 die hTRPC6-Kanal-Proteine exprimierenden HEK293 Zellen wurden für diese Angaben als Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwertes.

Bei einem Haltepotential von -60 mV betrug der Einwärtsstrom der hTRPC6-Kationen-Kanäle $-20,9 \pm 4,3\%$ der maximalen Stromantworten nach Rezeptorstimulation, der Auswärtsstrom beim Haltepotential von $+60$ mV dagegen $10,6 \pm 2,3\%$. Die Basalaktivität der hTRPC3-Kationen-Kanäle wurden ebenfalls bei einem Haltepotential von -60 mV bis $+60$ mV in der Ganzzellkonfiguration bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 wiedergegeben.

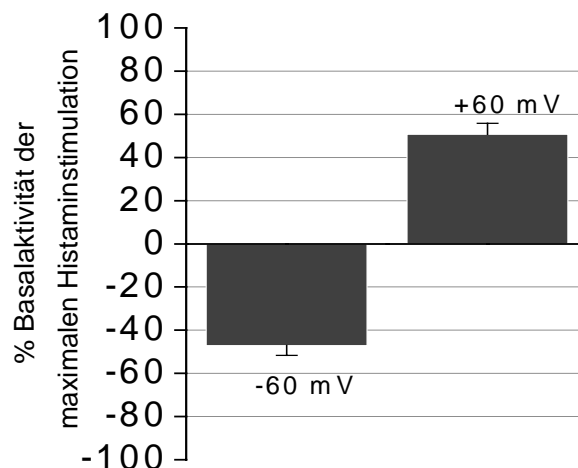


Abb. 24 Basalaktivität von hTRPC3. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Basalaktivität von hTRPC3 an der maximalen Stromantwort (auf 100% normiert) bei den Haltepotentialen von ± 60 mV. Angaben als Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwertes. Die Messungen von 14 hTRPC3 exprimierende HEK293 Zellen wurden für diese Abbildung berücksichtigt.

Die Basalaktivität der hTRPC3-Kationen-Kanäle betrug bei einem Haltepotential von -60 mV $-46,0 \pm 5,0\%$, beim Haltepotential von $+60$ mV $48,7 \pm 4,3\%$ der maximalen Stromantwort (auf 100% normiert). Die Basalaktivität der hTRPC3-Kationen-Kanäle war signifikant ($p < 0,002$) größer als die Basalaktivität der hTRPC6-Kationen-Kanäle. Die hTRPC3-Kationen-Kanäle besaßen also hinsichtlich des Ein- und Auswärtsstroms eine viel größere konstitutive Aktivität als die hTRPC6-Kationen-Kanäle. Die hTRPC3- und hTRPC6-Kanal-Proteine sind diesbezüglich funktionell nicht redundant.

3.1.2 Aktivierung von hTRPC3 und hTRPC6

Die hTRPC3- und hTRPC6-Kationen-Kanäle wurden durch Zugabe von Histamin in maximaler Wirkkonzentration ($100 \mu\text{M}$ Histamin) aktiviert. Die Spannungsrampen erstreckten sich von -100 mV bis $+60$ mV bei einer Frequenz von 1 Hz mit einem Anstieg von 40 mVs^{-1} .

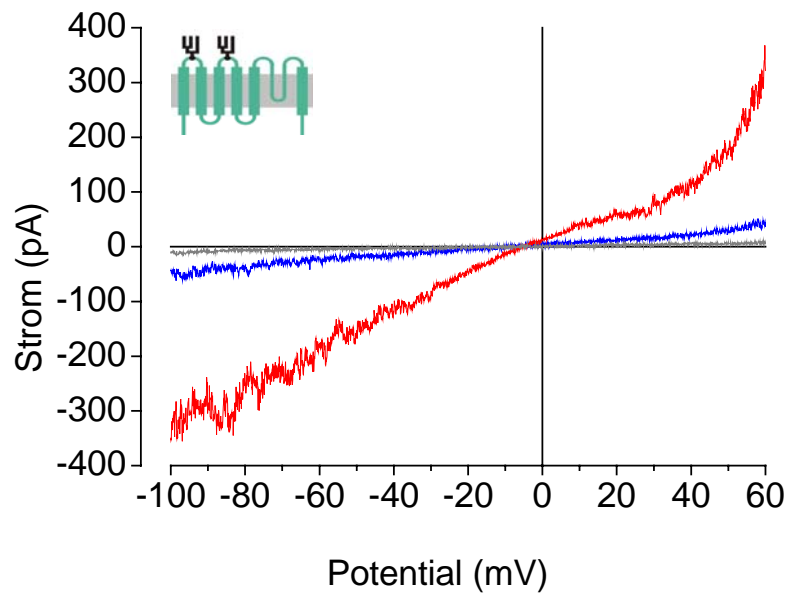


Abb. 25 Strom-Spannungskurve von hTRPC6. Stromantwort ist gegen das applizierte Potential aufgetragen. Der Potentialbereich erstreckt sich von -100 mV bis $+60$ mV. Dargestellt sind die Strom-Spannungsbeziehungen von HEK293 Zellen, die nicht mit pcDNA von hTRPC6 transfiziert wurden (grau), sowie von den hTRPC6-Kanal-Protein exprimierenden HEK293 Zellen vor (blau) und nach (rot) Histaminapplikation. Schematisch ist das Glykosylierungsmuster zu erkennen.

Auffallend war ein deutlicher Unterschied in der Strom-Spannungsbeziehung zwischen untransfizierten und den hTRPC6-Kanal-Protein exprimierenden HEK293 Zellen. Dies bedeutet, dass die von uns gemessene Stromantwort weder ein Effekt der HEK293 Zelle selbst war noch auf eine Aktivität von anderen endogenen Kanal-Proteinen zurückgeführt werden konnte. Die Strom-Spannungsbeziehung war typisch für hTRPC6 mit einem Wendepunkt ca. $+20$ mV. Wie Abbildung 25 erläutert, zeigten hTRPC6-Kationen-Kanäle nach Rezeptorstimulation maximale Stromantworten. Dieselben Resultate wurden mit Carbachol als Agonist in maximaler Wirkkonzentration ($100 \mu\text{M}$ Carbachol) erzeugt. Zuvor waren die untersuchten HEK293 Zellen mit pcDNA des rM_5 -Muscarin-Rezeptors transfiziert worden. Die Aktivierung und die Strom-Spannungsbeziehung hängen also nicht von der Art des kotransfizierten Rezeptors ab, sondern sind eine Eigenschaft des durch die Kanal-Proteine gebildeten Kationen-Kanals selbst. Abbildung 26 zeigt die Aktivierung der hTRPC3-Kationen-Kanäle.

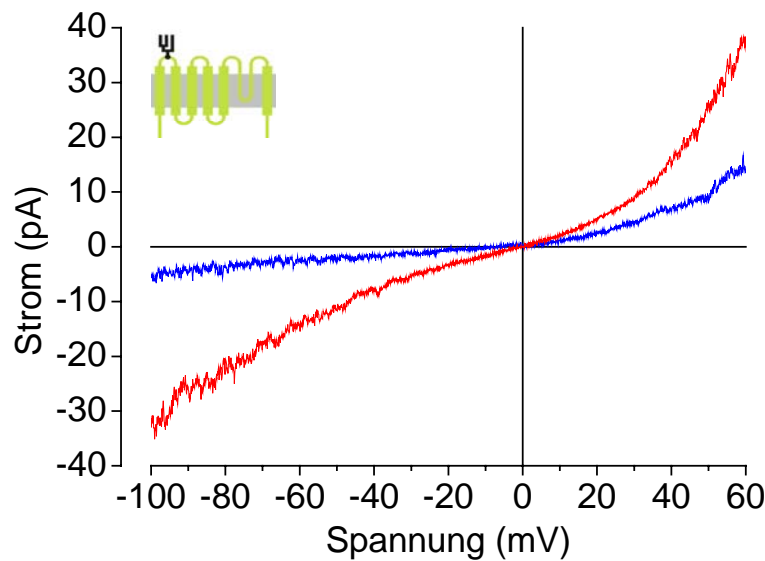


Abb. 26 Strom-Spannungskurve von hTRPC3. Dargestellt ist die Stromantwort der hTRPC3-Kationen-Kanäle, aufgetragen gegen das applizierte Potential. Die blaue Strom-Spannungsbeziehung zeigt die Stromantwort vor, die rote die Stromantwort nach Histaminapplikation. Die Haltepotentiale lagen bei -100 mV bis $+60$ mV. Zudem ist die schematische Darstellung des Glykosylierungsmusters zu sehen.

Bei Betrachtung der Strom-Spannungskurve zeigten die hTRPC3-Kationen-Kanäle den für sie typischen Kurvenverlauf. Im Vergleich zu hTRPC6 wiesen die hTRPC3-Kationen-Kanäle einen Wendepunkt beider Strom-Spannungsbeziehungen auf, der nicht im positiven Potentialbereich lag, sondern bei ca. 0 mV lag. Auch die hTRPC3-Kationen-Kanäle zeigten nach Rezeptorstimulation eine Stromzunahme in Ein- und Auswärtsrichtung.

Nach Aktivierung mittels Histamin wurden die Spannungsrampen von -100 mV bis $+60$ mV so lange appliziert, bis die kleinstmöglichen Stromantworten gemessen werden konnten. Diese nach Aktivierung ermittelten Stromantworten entsprachen den initialen Stromantworten vor Aktivierung. Die durch die hTRPC3 und hTRPC6-Kanal-Protein gebildeten Kationen-Kanäle zeigen diesbezüglich eine vollständige Inaktivierung ohne Verlust der Basalaktivität. Eine erneute Applikation von Histamin nach Auswaschen desselben durch Histamin-freie Badlösung konnte keine erneute Aktivierung herbeiführen. Die Kationen-Kanäle blieben im inaktivierbaren Zustand.

3.1.3 Stromverlauf von hTRPC3 und hTRPC6

Die Basalaktivität, die maximalen Stromantworten unter Histaminapplikation sowie die Stromantworten nach Inaktivierung werden zusammenfassend als Stromantwort-Zeit-Achse in Abbildung 27 als Stromverlauf dargestellt. Man erkennt deutlich die sofortige Generierung eines maximalen Ein- und Auswärtsstroms nach Histaminapplikation. Histamin wurde nach ca. 60 s hinzugegeben und erreichte mit einer durch den Austausch der Badlösungen bedingten Latenz etwa 15 s die zu messende HEK293 Zelle. hTRPC6 zeigte nach Histaminapplikation eine prompte Aktivierung.

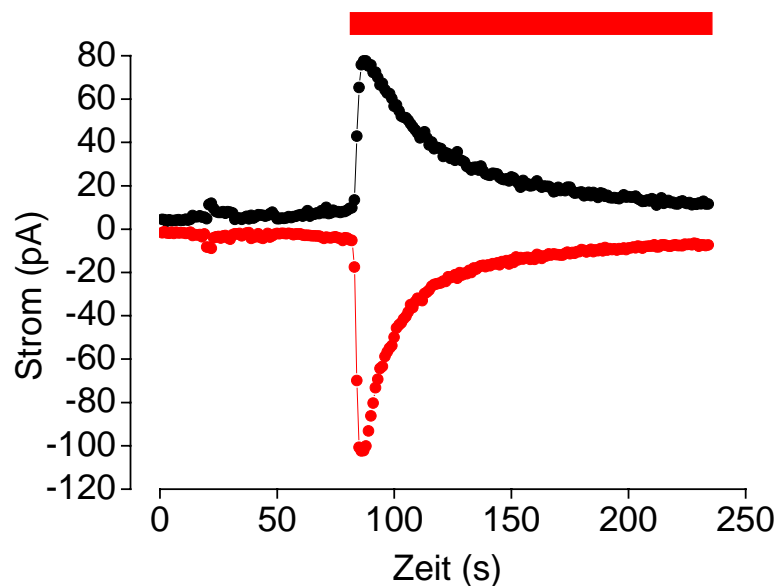


Abb. 27 Stromverlauf von hTRPC6. Dargestellt ist die Stromantwort der hTRPC6-Kationen-Kanäle, aufgetragen gegen die Zeit. Das rote Punkt-Linien-Diagramm zeigt den Einwärtsstrom, das schwarze den Auswärtsstrom. Aktiviert wurden die hTRPC6-Kationen-Kanäle durch die Zugabe von 100 μ M Histamin. Gemessen wurde bei Potentialbereichen von -100 mV bis $+60$ mV. Die initialen Stromantworten wurden nach ca. 150 s erreicht. Der rote Balken stellt die Dauer der Histaminapplikation dar.

Die Ergebnisse veranschaulichen, dass die hTRPC6-Kationen-Kanäle bei geringer konstitutiver Aktivität erst bei Anwesenheit eines Agonisten eine maximale Stromantwort aufwiesen, nach Aktivierung in einen inaktiven Zustand übergingen und wieder die initialen Stromantworten zeigten. Die Funktion der hTRPC6-Kationen-Kanäle muss demzufolge einer feinen Regulation unterliegen. Die Basalaktivität der hTRPC3-Kationen-Kanäle, ihre maximale Stromantwort nach Histaminzufuhr sowie ihre Stromantworten nach Inaktivierung werden in Abbildung 28 zusammenfassend

gegen die Zeit aufgetragen und als Stromverlauf dargestellt. Wie schon bei den hTRPC6-Kationen-Kanälen ließ sich auch bei den hTRPC3-Kationen-Kanälen durch Histaminapplikation ein sofortiger maximaler Ein- und Auswärtsstrom generieren. Histamin wurde nach ca. 80 s hinzugegeben und zeigte nach einer durch den Austausch der Badlösung bedingten Latenz von nahezu 15 s eine sofortige Wirkung. Die initialen Stromantworten wurden nach 200 bis 300 s erreicht.

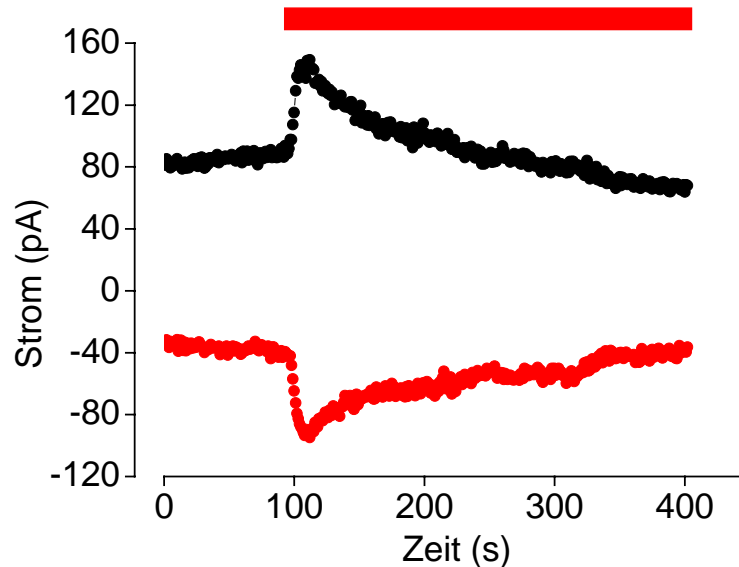


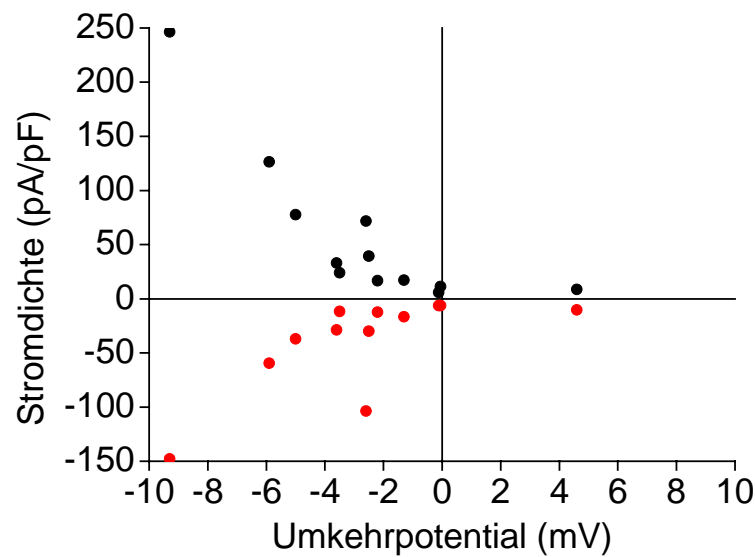
Abb. 28 Stromverlauf von hTRPC3. Dargestellt ist die Stromantwort der hTRPC3-Kationen-Kanäle, aufgetragen gegen die Zeit. Das rote Punkt-Linien-Diagramm zeigt den Einwärtsstrom, das schwarze den Auswärtsstrom. Aktiviert wurden hTRPC3-Kationen-Kanäle durch Histamin in maximaler Wirkkonzentration. Gemessen wurde bei Potentialbereichen von -100 mV bis $+60$ mV bis zum Erreichen der initialen Stromantworten (ca. 200 - 300 s). Der rote Balken stellt die Dauer der Histaminapplikation dar.

Die hTRPC3-Kanal-Proteine bilden also Kationen-Kanäle mit signifikant größerer konstitutiver Aktivität als die hTRPC6-Kationen-Kanäle. Maximale Stromantworten ließen sich ebenso wie bei den hTRPC6-Kanal-Proteinen erst durch Zusatz von Histamin in maximaler Wirkkonzentration ($100 \mu\text{M}$ Histamin) hervorrufen. Aufgrund der hohen konstitutiven Aktivität müssen die hTRPC3-Kationen-Kanäle einer Regulation unterworfen sein, die nicht der von den hTRPC6-Kationen-Kanäle entspricht. hTRPC3 und hTRPC6 sind also diesbezüglich funktionell nicht redundant und können somit unterschiedliche zelluläre Aufgaben besitzen.

3.1.4 Umkehrpotential von hTRPC3 und hTRPC6

Am Umkehrpotential heben sich der Einwärtsstrom und der Auswärtsstrom auf. Der Nettostrom ist gleich Null. Dargestellt ist das Umkehrpotential vor und nach Histaminapplikation. Zudem wird das Umkehrpotential gegen die Stromdichte aufgetragen.

a)



b)

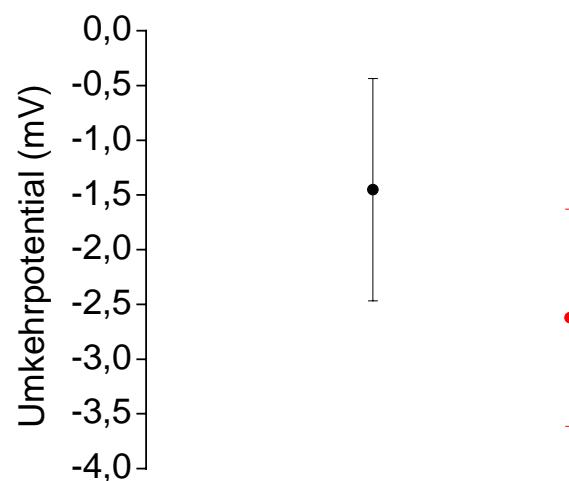


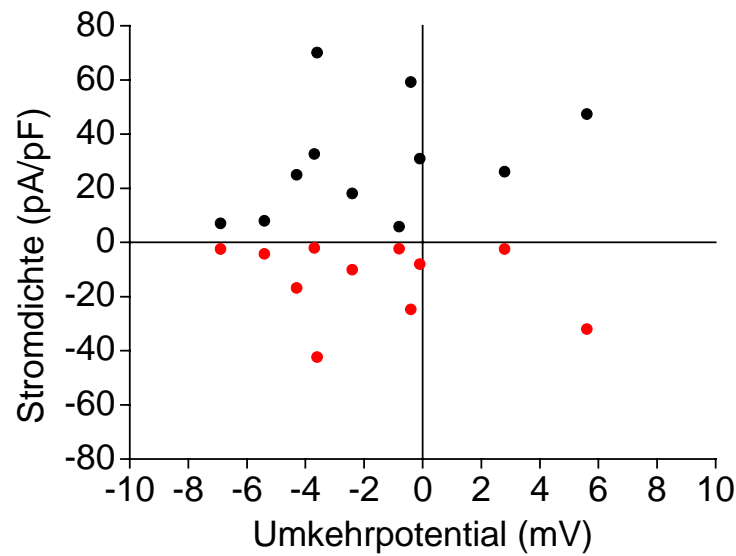
Abb. 29 Umkehrpotential von hTRPC6. In Abbildung (a) ist das Umkehrpotential der hTRPC6-Kationen-Kanäle gegen die Stromdichte aufgetragen. Die Abbildung (b) spiegelt den Wert des Umkehrpotentials vor (schwarz) und unter (rot) Histaminzufuhr wider. Angaben als Mittelwert mit der

3. Ergebnisse

Standardabweichung des Mittelwertes. Beide Abbildungen wurden durch Ergebnisse von 12 hTRPC6-Kanal-Protein exprimierenden HEK293 Zellen erstellt.

Wie Abbildung 29 darstellt, lagen fast alle ermittelten Umkehrpotentiale im negativen Bereich. Das gemittelte Umkehrpotential der hTPC6-Kationen-Kanäle lag vor Histaminzufuhr bei etwa $-1,5 \pm 1,0$ mV, während der Rezeptorstimulation durch Histaminapplikation bei ca. $-2,6 \pm 1,0$ mV.

a)



b)

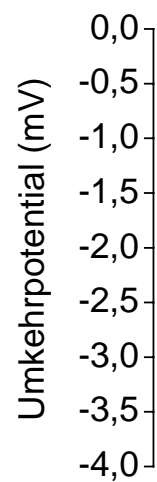


Abb. 30 Umkehrpotential von hTRPC3. In Abbildung (a) ist das Umkehrpotential der hTRPC3-Kationen-Kanäle gegen die Stromdichte aufgetragen. Die Abbildung (b) spiegelt den Wert des Umkehrpotentials vor (schwarz) und unter (rot) Histaminzufuhr wider. Angaben als Mittelwert mit der

3. Ergebnisse

Standardabweichung des Mittelwertes. Beide Abbildungen wurden durch Ergebnisse von 11 hTRPC3-Kanal-Protein exprimierenden HEK293 Zellen erstellt.

Nach Abbildung 30 (a) und (b) lagen fast alle ermittelten Umkehrpotentiale der hTRPC3-Kationen-Kanäle im negativen Bereich. Eine Beziehung zwischen Stromdichte und Umkehrpotentials ließ sich nicht erkennen. Vor Histaminapplikation lag das gemittelte Umkehrpotential der hTRPC3-Kationen-Kanäle bei $-2,1 \pm 0,8$ mV, während der Rezeptorstimulation mittels Histaminzufuhr bei $-1,7 \pm 1,1$ mV. Ein signifikanter Unterschied zu den hTRPC6-Kationen-Kanäle bestand nicht. Auch nach Auftragen des Umkehrpotentials gegen die Stromdichte ließ sich kein signifikanter Unterschied zu den hTRPC6-Kationen-Kanäle feststellen.

3.1.5 Biophysikalische Eigenschaften von mTRPC7

Die biophysikalischen Eigenschaften von mTRPC7 werden der Vollständigkeit halber kurz dargestellt. Anstatt des humanen (h) hTRPC7-Kanal-Protein wurde das mauseigene (m) mTRPC7-Kanal-Protein verwendet. Zunächst wurde die Basalaktivität der mTRPC7-Kationen-Kanäle in der Ganzzellkonfiguration bei Haltepotentialen von ± 60 mV ohne Zusatz von Histamin bestimmt. Die Basalaktivität ist in Abbildung 31 dargestellt.

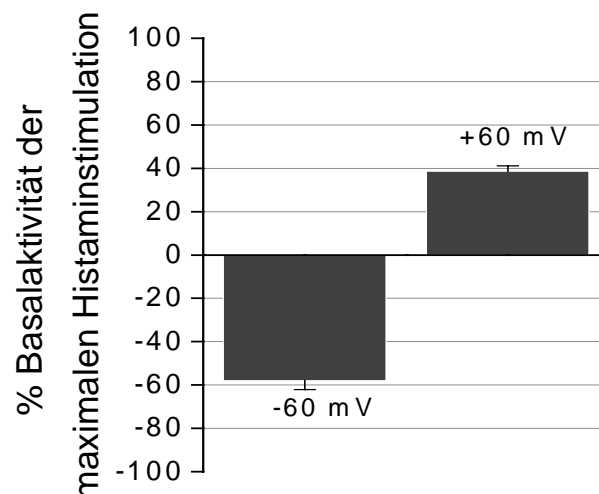


Abb. 31 Basalaktivität von mTRPC7. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Basalaktivität der mTRPC7-Kationen-Kanäle an der maximalen Stromantwort (normiert auf 100%) nach Histaminzufuhr. Gemessen wurde bei Haltepotentialen von ± 60 mV. Angaben als Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwertes. Die Abbildung beinhaltet die Messdaten von 35 das mTRPC7-Kanal-Protein exprimierenden HEK293 Zellen.

Die Basalaktivität des Einwärtsstroms der mTRPC7-Kationen-Kanäle betrug ca. $-55 \pm 3\%$ der maximalen Stromantwort nach Histaminapplikation, die des Auswärtsstroms etwa $38 \pm 2\%$. Die mTRPC7-Kationen-Kanäle besaßen wie die hTRPC3-Kationen-Kanäle eine hohe konstitutive Aktivität. Verglichen mit hTRPC3 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Signifikante Unterschiede bestanden allerdings zu den hTRPC6-Kationen-Kanäle, die eine bedeutend kleinere Basalaktivität aufwiesen.

Ob die mTRPC7-Kationen-Kanäle durch Histaminapplikation aktiviert werden konnten, zeigt die nächste Graphik. Wie auf Abbildung 32 zu erkennen, zeigten die mTRPC7-Kationen-Kanäle nach Histaminzufuhr in maximaler Wirkkonzentration ($100 \mu\text{M}$ Histamin) prompt eine maximale Stromantwort. Damit unterschieden sich die mTRPC7-Kationen-Kanäle nicht von den hTRPC3- oder hTRPC6-Kationen-Kanäle. Alle Wildtyp-Kanal-Proteine der hTRPC3,6,7-Subfamilie zeigten nach Zufuhr eines Agonisten in maximaler Wirkkonzentration maximale Stromantworten. Sie erwiesen sich damit als rezeptorgesteuerte Kationen-Kanäle.

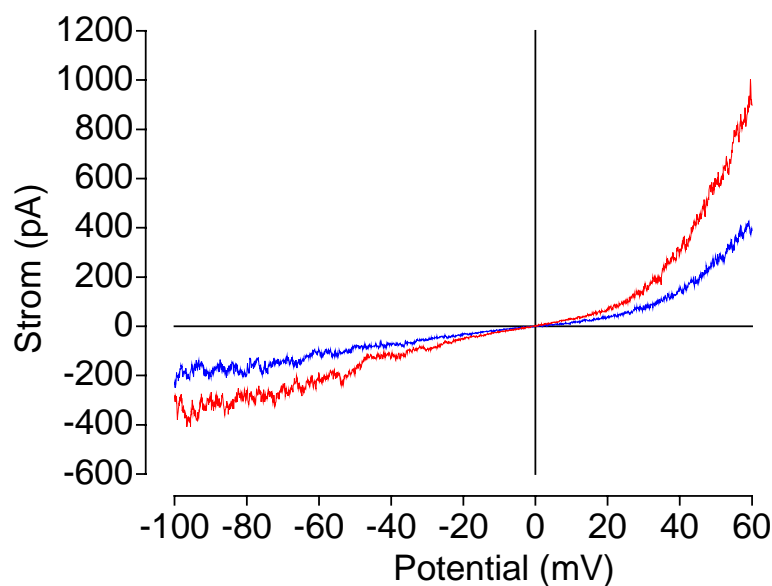


Abb. 32 Strom-Spannungskurve von hTRPC7. Dargestellt ist die Stromantwort der mTRPC7-Kationen-Kanäle, aufgetragen gegen das applizierte Potential. Das Haltepotential erstreckt sich von -100 mV bis $+60 \text{ mV}$. Die blaue Strom-Spannungsbeziehung zeigt die Stromantwort vor, die rote die Stromantwort unter Histaminapplikation.

Dargestellt ist die für die mTRPC7-Kationen-Kanäle typische Strom-Spannungsbeziehung. Der Wendepunkt des Kurvenverlaufs lag in etwa auf dem Nullpunkt bei 0 mV und unterschied sich damit nicht signifikant von den hTRPC3- und

hTRPC6-Kationen-Kanäle. Wie die hTRPC3-Kationen-Kanäle zeigten die mTRPC7-Kationen-Kanäle eine hohe konstitutive Aktivität. Ob es Unterschiede beim Umkehrpotential gab, zeigt Abbildung 33.

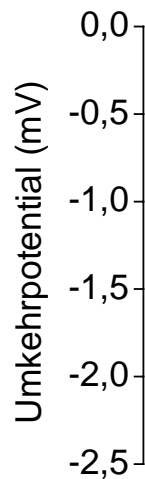


Abb. 33 Umkehrpotential von mTRPC7. In Abbildung (a) ist das Umkehrpotential der mTRPC7-Kationen-Kanäle gegen die Stromdichte aufgetragen. Die Abbildung (b) spiegelt den Wert des Umkehrpotentials vor (schwarz) und unter (rot) Histaminzufuhr wider. Angaben als Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwertes. Beide Abbildungen wurden durch Ergebnisse von 25 mTRPC7-Kanal-Protein exprimierenden HEK293 Zellen erstellt.

Vor Aktivierung durch Histamin in maximaler Wirkkonzentration (100 μ M Histamin) betrug das Umkehrpotential etwa $-1,5 \pm 0,8$ mV, unter Histaminapplikation etwa $-1,3 \pm 1,0$ mV und lag damit im negativen Bereich. Verglichen mit hTRPC3 und hTRPC6 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Das bedeutet, dass die Ionenselektivität aller drei Kanal-Proteine unter den gegebenen Bedingungen ähnlich war.

Fasst man die Basalaktivität der mTRPC7-Kationen-Kanäle, ihre maximale Stromantworten nach Zugabe von Histamin sowie ihre Stromantworten nach Inaktivierung zusammen auf einer Stromantwort-Zeit-Achse als Stromverlauf, dann lassen sich folgendes Aussagen treffen.

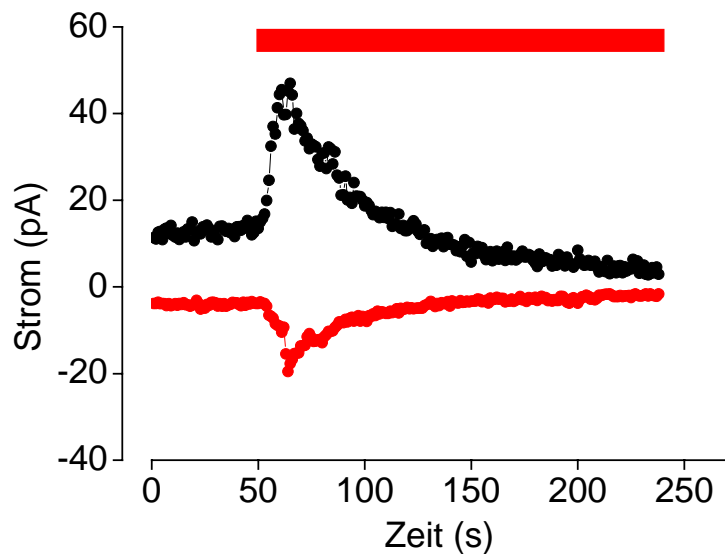


Abb. 34 Stromverlauf von mTRPC7. Dargestellt ist die Stromantwort der mTRPC7-Kationen-Kanäle, aufgetragen gegen die Zeit. Das rote Punkt-Linien-Diagramm zeigt den Einwärtsstrom, das schwarze den Auswärtsstrom. Aktiviert wurden mTRPC7-Kationen-Kanäle durch Histamin in maximaler Wirkkonzentration. Gemessen wurde bei Potentialbereichen von -100 mV bis $+60$ mV. Die vollständige Inaktivierung wurde nach ca. 200 s erreicht. Gut zu sehen ist der Verlust der Basalaktivität. Der rote Balken stellt die Dauer der Histaminapplikation dar.

Die mTRPC7-Kationen-Kanäle zeigten unter Histaminapplikation sofort maximale Stromantworten. Wie Abbildung 34 zeigt, wurde Histamin nach ca. 50 s hinzu gegeben. Die Latenz der Wirkung ergab sich aus der Dauer, die für den Austausch der Badlösungen benötigt wurden. Initiale Stromantworten ließen sich nach 250 s nicht wieder messen. Die mTRPC7-Kanal-Proteine zeigten eine vollständige Inaktivierung mit Verlust der Basalaktivität. Eine erneute Applikation von Histamin nach Auswaschen desselben durch Histamin-freie Badlösung konnte keine erneute Aktivierung herbeiführen. Die mTRPC7-Kationen-Kanäle blieben im inaktivierbaren Zustand.

Die mTRPC7-Kationen-Kanäle zeigten biophysikalische Eigenschaften, die denen der hTRPC3-Kationen-Kanäle ähnlich waren. Die mTRPC7-Kanal-Proteine bildeten demzufolge funktionelle Kanäle, die eine große konstitutive Aktivität besitzen. Damit unterschieden sich die mTRPC7-Kationen-Kanäle deutlich von den hTRPC6-Kationen-Kanälen.

Die zu Anfang gestellte Frage, ob die hTRPC3- und hTRPC6-Kanal-Proteine funktionell redundant sind, muss verneint werden. Sie besitzen z.T. signifikant unterschiedliche biophysikalische Eigenschaften. Es muss angenommen werden, dass

die hTRPC3- und hTRPC6-Kationen-Kanäle unterschiedlich reguliert werden. Die nächste Frage, ob und inwiefern das Glykosylierungsmuster beider Kanal-Proteine ihre unterschiedlichen biophysikalischen Eigenschaften bedingt, wird durch die folgenden Untersuchungen ihrer Glykosylierungsmutanten beantwortet.

3.2 Kanäle mit Veränderungen der Glykosylierungsstruktur

Das hTRPC6-Kanal-Protein besitzt insgesamt 7 potentielle Glykosylierungsstellen, von denen zwei in den Extrazellulärraum ragen und über N-glykosidische Bindungen Glykosylierungsstrukturen tragen. Die dem N-Terminus nähere Glykosylierung (473. Aminosäurestelle) liegt auf der ersten extrazellulären Schlinge (e1) und entspricht in etwa dem einfach glykosylierten Asparagin beim hTRPC3-Kanal-Protein. Die zweite Glykosylierungsstelle (561. Aminosäurestelle) liegt auf der zweiten extrazellulären Schlinge (e2) und besitzt kein Gegenstück beim hTRPC3-Kanal-Protein, das daraufhin extrazellulär nur monoglykosyliert ist. Aus dem hTRPC6-Kanal-Protein wurden drei Glykosylierungsmutanten (hTRPC6-N473Q, hTRPC6-N561Q und hTRPC6-N473Q-N561Q) erschaffen. Beide extrazellulären Glykosylierungsstrukturen wurden nacheinander entfernt, indem das für ihre Verankerung notwendige Asparagin ausgetauscht wurde. Damit keine Konformitätsänderungen des Proteins auftraten und die ursprüngliche Ladungsverteilung innerhalb des Ionenkanals erhalten blieb, wurde anstatt des Asparagin (N) das strukturähnliche Glutamin (Q) verwendet. hTRPC6-N473Q zeigte in allen Messungen keine Aktivierbarkeit und floss dementsprechend nicht in die weitere Betrachtung ein.

hTRPC3 erhielt durch Austausch der Aminosäure Glutamat (E) durch Asparagin (N) an seiner zweiten nicht glykosylierten extrazellulären Schlinge (512. Aminosäurestelle) eine zusätzliche Glykosylierungsstruktur. Es entstand die Glykosylierungsmutante hTRPC3-E512N. Im Folgenden werden die biophysikalischen Eigenschaften der Glykosylierungsmutanten vorgestellt.

3.2.1 hTRPC6-N561Q

In der Ganzzellkonfiguration wurde bei einem Haltepotential von ± 60 mV ohne Histaminapplikation zunächst die Stromdichte bestimmt.

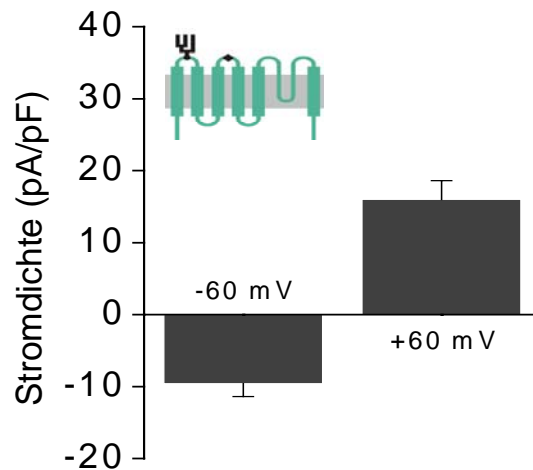
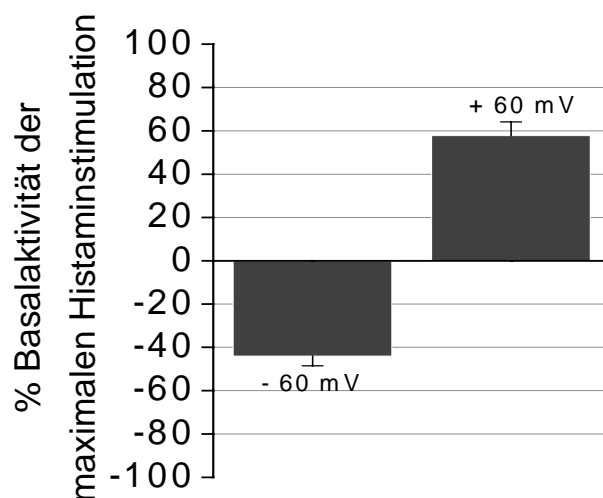


Abb. 35 Stromdichte von hTRPC6-N561Q. Dargestellt ist die Einwärts- und Auswärtsstromdichte der hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle bei Haltepotentialen von ± 60 mV. Angaben als Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwertes. Insgesamt gingen die Messungen von 18 das hTRPC6-N561Q-Kanal-Protein exprimierenden HEK293 Zellen in die Abbildung ein. Zudem ist hier das Glykosylierungsmuster schematisch dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die fehlende Glykosylierungsstruktur an der zweiten extrazellulären Schlinge.

Wie Abbildung 35 darstellt, besaßen die hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle exprimierenden HEK293 Zellen eine Ein- und Auswärtsstromdichte, die der Stromdichte der hTRPC3-Kationen-Kanäle ähnelten. Beim Haltepotential von +60 mV betrug die Auswärtsstromdichte ca. $15,0 \pm 3,0$ pA/pF, beim Haltepotential von -60 mV die Einwärtsstromdichte etwa $10,0 \pm 2,0$ pA/pF. Sie war damit signifikant größer als bei den hTRPC6-Kationen-Kanäle ($p < 0,01$).



3. Ergebnisse

Abb. 36 Basalaktivität von hTRPC6-N561Q. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Basalaktivität der hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle an der maximalen Stromantwort (normiert auf 100%) nach Histaminzufuhr. Gemessen wurde bei Haltepotentialen von ± 60 mV. Angaben als Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwertes. Die Abbildung beinhaltet die Messdaten von 11 das hTRPC6-N561Q-Kanal-Protein exprimierenden HEK293 Zellen.

Die Basalaktivität der hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle betrug, wie auf Abbildung 36 zu sehen ist, beim Haltepotential von -60 mV etwa $-44,9 \pm 4,3\%$ sowie beim Haltepotential von $+60$ mV ca. $47,4 \pm 4,1\%$ der maximalen Stromantworten unter Histaminapplikation. Die Elimination der zweiten Glykosylierungsstelle des hTRPC6-Kanal-Proteins bewirkte also eine signifikante ($p < 0,01$) Zunahme der Basalaktivität.

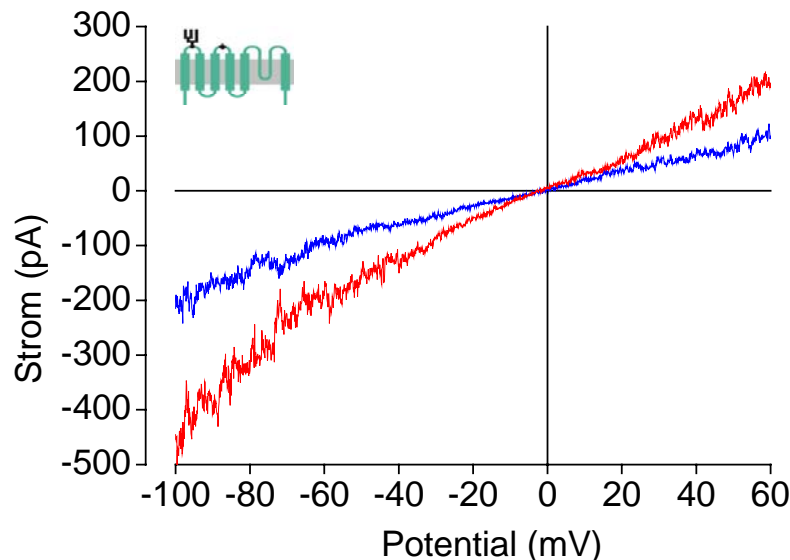


Abb. 37 Strom-Spannungskurve von hTRPC6-N561Q. Dargestellt ist die Stromantwort der hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle, aufgetragen gegen das applizierte Potential. Die blaue Strom-Spannungsbeziehung zeigt die Stromantwort vor, die rote die Stromantwort nach Histaminapplikation. Die Haltepotentiale lagen bei -100 mV bis $+60$ mV. Zudem ist die schematische Darstellung des Glykosylierungsmusters zu sehen.

Die hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle zeigten nach Histaminapplikation sofort maximale Stromantworten, wie sie oben als rote Strom-Spannungsbeziehung in Abbildung 37 zu sehen ist. Beim Vergleich der Kurvenverläufe der hTRPC6- und hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle fiel eine veränderte Auswärtsrektifizierung der Glykosylierungsmutante nach Histaminapplikation auf. Damit unterschieden sich die hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle sowohl von den hTRPC6- als auch von den hTRPC3-Kationen-Kanäle.

Werden Basalaktivität, maximale Stromantwort nach Histaminapplikation sowie Stromantworten nach Inaktivierung zusammengefasst und gegen die Zeit aufgetragen, stellt sich der in Abbildung 38 wiedergegebene Stromverlauf dar.

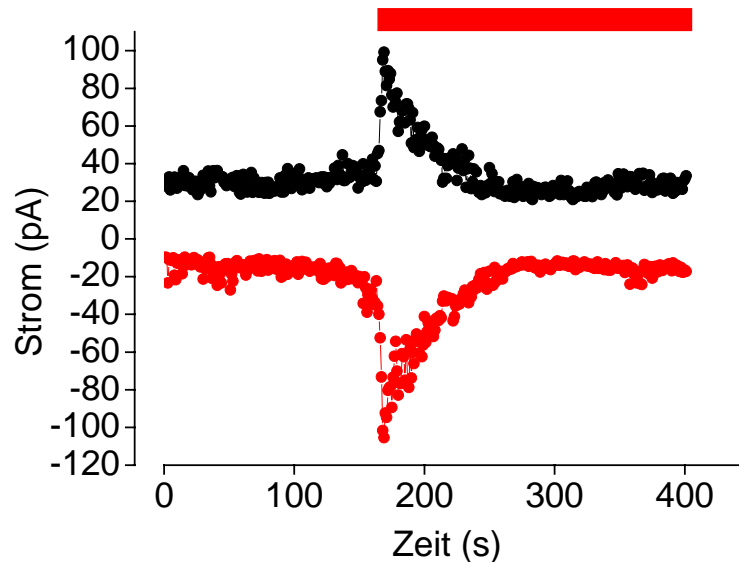


Abb. 38 Stromverlauf von hTRPC6-N561Q. Dargestellt ist die Stromantwort der hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle, aufgetragen gegen die Zeit. Das rote Punkt-Linien-Diagramm zeigt den Einwärtsstrom, das schwarze den Auswärtsstrom. Aktiviert wurden hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle durch Histamin in maximaler Wirkkonzentration. Gemessen wurde bei Potentialbereichen von -100 mV bis $+60$ mV bis zum Erreichen der initialen Stromantworten (ca. 100 s). Der rote Balken stellt die Dauer der Histaminapplikation dar.

Wie schon bei den Wildtyp-Kanal-Proteinen hTRPC3 und hTRPC6 generierte die Zugabe von Histamin in maximaler Wirkkonzentration sofort eine maximale Stromantwort. Histamin wurde hier nach ca. 150 s hinzugegeben und bewirkte sofort eine Aktivierung. Nach Inaktivierung ließen sich ebenfalls die initialen Stromantworten feststellen. Durch Elimination der zweiten Glykosylierungsstruktur war die Basalaktivität der hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle im Vergleich zu den hTRPC6-Kationen-Kanäle signifikant ($p < 0,01$) größer. Die hTRPC6-N562Q-Kanal-Proteine bildeten demzufolge funktionelle Kanäle mit hoher konstitutiver Aktivität. Dies wurde schon für die hTRPC3-Kationen-Kanäle nachgewiesen. Die folgenden Untersuchungen werden die Auswirkungen auf die biophysikalischen Eigenschaften zeigen, die nach Elimination der letzten verbliebenen extrazellulären Glykosylierungsstruktur auftraten.

3.2.2 hTRPC6-N473Q-N561Q

Wie bei hTRPC6-N561Q wurde auch bei hTRPC6-N473Q-N561Q zunächst die Stromdichte in der Ganzzellkonfiguration ohne Histaminapplikation bestimmt.

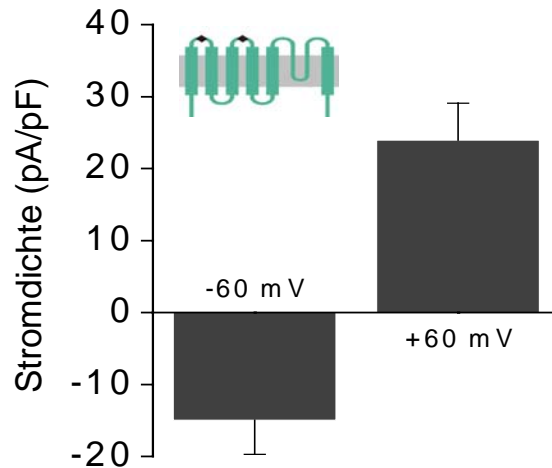


Abb. 39 Stromdichte von hTRPC6-N473Q-N561Q. Dargestellt ist die Einwärtsstromdichte der hTRPC6-N473Q-N561Q-Kationen-Kanäle bei einem Haltepotential von -60 mV und die Auswärtsstromdichte beim Haltepotential von $+60$ mV. Angaben als Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwertes. Insgesamt wurden 18 das hTRPC6-N473Q-N561Q-Kanal-Protein exprimierende HEK293 Zellen für diese Abbildung berücksichtigt. Zudem ist hier schematisch das extrazelluläre Glykosylierungsmuster zu erkennen. Alle extrazellulären Glykosylierungsstrukturen wurden entfernt.

Die Auswärtsstromdichte betrug ca. $24,5 \pm 5,0$ pA/pF, die Einwärtsstromdichte etwa $14,5 \pm 4,0$ pA/pF. Die Elimination der zweiten Glykosylierungsstruktur bei den hTRPC6-N473Q-N561Q-Kanal-Proteine bewirkte eine weitere Vergrößerung der Stromdichte sowohl bei positiven als auch bei negativen Haltepotentialen. Die Einwärts- und Auswärtsstromdichte entsprachen nun annähernd der von den hTRPC3-Kationen-Kanälen. Die Basalaktivität der hTRPC6-N473Q-N561Q-Kationen-Kanäle wurde ebenfalls in der Ganzzellkonfiguration bestimmt. Abbildung 40 veranschaulicht die Ergebnisse.

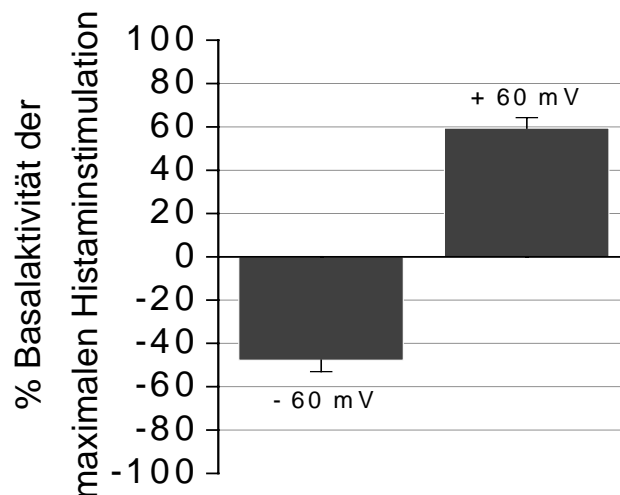


Abb. 40 Basalaktivität von hTRPC6-N473Q-N561Q. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Basalaktivität der hTRPC6-N473Q-N561Q-Kationen-Kanäle an der maximalen Stromantwort (als 100% normiert). Die Haltepotentiale betrugen wiederum ± 60 mV. Die gemittelten Messwerte von 16 das hTRPC6-Kanal-Protein exprimierenden HEK293 Zellen wurden für diese Darstellung verwendet. Angaben als Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwertes.

Die Basalaktivität betrug bei einem Haltepotential von -60 mV $-47,6 \pm 5,3\%$ und beim Haltepotential von $+60$ mV $59,4 \pm 4,9\%$ der maximalen Stromantwort nach Histaminapplikation. Im Vergleich zu den hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanälen hat die Elimination einer weiteren Glykosylierungsstruktur, wie beim hTRPC6-N473Q-N561Q-Kanal-Protein geschehen, eine weitere Vergrößerung der Basalaktivität bewirkt. Ein signifikanter Unterschied zu den hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanälen besteht allerdings nicht, wohl aber zu den hTRPC6-Kationen-Kanälen ($p < 0,01$). Die Glykosylierungsmutante hTRPC6-N473Q-N561Q zeigte ebenfalls nach Histaminapplikation maximale Stromantworten. Dargestellt ist dies in Abbildung 41.

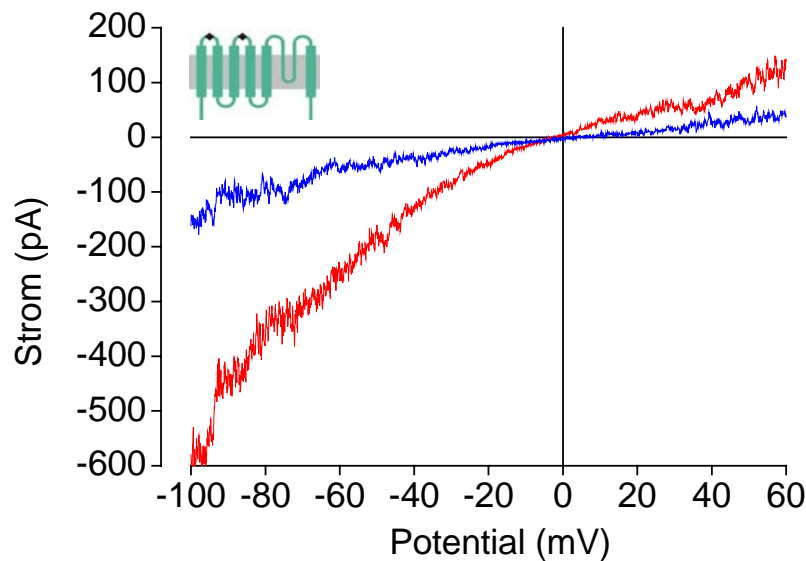


Abb. 41 Strom-Spannungskurve von hTRPC6-N473Q-N561Q. Dargestellt ist die Stromantwort der hTRPC6-N473Q-N561Q-Kationen-Kanäle, aufgetragen gegen das applizierte Potential. Die blaue Strom-Spannungsbeziehung zeigt die Stromantwort vor, die rote die Stromantwort nach Histaminapplikation. Die Haltepotentiale lagen bei -100 mV bis $+60$ mV. Zudem ist die schematische Darstellung des Glykosylierungsmusters zu sehen.

Auch die hTRPC6-N473Q-N561Q-Kationen-Kanäle zeigten im Vergleich zu den hTRPC6-Kationen-Kanälen eine veränderte Auswärtsrektifizierung. Anzumerken ist, dass die Messungen der Glykosylierungsmutante hTRPC6-N473Q-N561Q insgesamt sehr schwierig waren. Die meisten hTRPC6-N473Q-N561Q-Kanal-Protein exprimierende HEK293 Zellen zeigten unter Rezeptorstimulation große Leckströme. Die letzten Stromantworten nach Inaktivierung entsprachen nahezu den initialen Werten (Abbildung 42). Initiale Stromantworten konnten allerdings nicht mehr erreicht werden. Es ist davon auszugehen, dass auch diese Glykosylierungsmutante nach Inaktivierung wieder die initialen Stromantworten zeigt. Nach Zugabe von Histamin in maximaler Wirkkonzentration zeigten die hTRPC6-N473Q-N561Q-Kationen-Kanäle sofort maximale Stromantworten und unterschieden sich darin nicht von den bisher untersuchten Kanal-Proteinen.

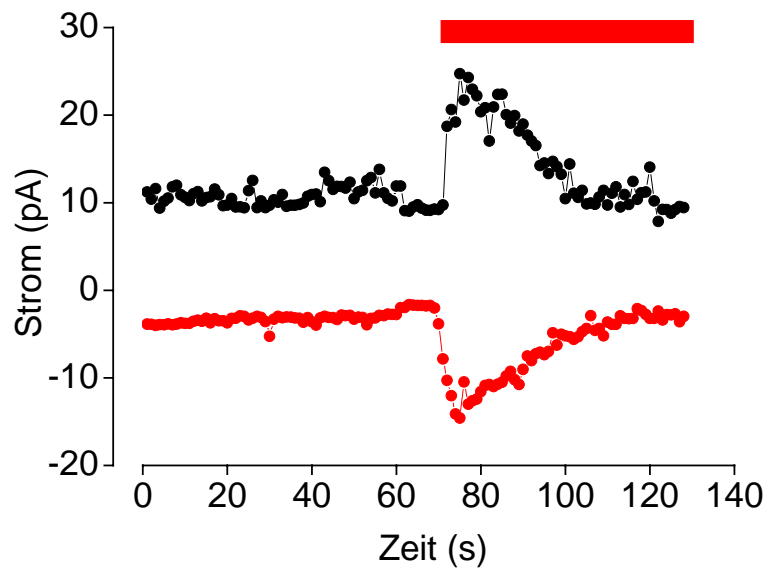


Abb. 42 Stromverlauf von hTRPC6-N473Q-N561Q. Dargestellt ist die Stromantwort der hTRPC6-N472Q-N561Q-Kationen-Kanäle, aufgetragen gegen die Zeit. Das rote Punkt-Linien-Diagramm zeigt den Einwärtsstrom, das schwarze den Auswärtsstrom. Aktiviert wurden hTRPC6-N473Q-N561Q-Kationen-Kanäle durch Histamin in maximaler Wirkkonzentration. Gemessen wurde bei Potentialbereichen von -100 mV bis $+60$ mV bis zum Erreichen der initialen Stromantworten (ca. 60 s). Der rote Balken stellt die Dauer der Histaminapplikation dar.

Die obigen Ergebnisse zeigen eindrücklich, wie durch Veränderung der Glykosylierungsstruktur biophysikalische Eigenschaften geändert werden. Die Kationen-Kanäle der Glykosylierungsmutanten wiesen eine signifikant größerer Basalaktivität als die durch die hTRPC6-Kanal-Proteine gebildeten Kationen-Kanäle auf ($p < 0,01$). Damit entsprechen sie hTRPC3, einem Kanal-Protein, das funktionelle Kanäle mit großer konstitutiver Aktivität bildet. Maximale Stromantworten wurden auch hier durch Zugabe des Agonisten Histamin generiert. Allerdings zeigten sowohl die hTRPC6-N561Q- als auch die hTRPC6-N473Q-N561Q-Kationen-Kanäle eine Veränderung der Auswärtsrektifizierung. Diese entsprach weder der Auswärtsrektifizierung der hTRPC6- noch der von den hTRPC3-Kationen-Kanäle. Die Elimination der Glykosylierungsstrukturen des hTRPC6-Kanal-Proteins hatte eine Änderung seiner biophysikalischen Eigenschaften hervorgerufen. Es war anzunehmen, dass die biophysikalischen Eigenschaften der hTRPC3-Kationen-Kanäle ebenfalls durch seine Glykosylierungsstruktur bestimmt werden. Die folgenden Untersuchungen werden diese Annahme bestätigen.

3.2.3 hTRPC3-E512N

Wie bei den hTRPC6-N561Q- und hTRPC6-N473Q-N561Q-Kationen-Kanälen wurde die Stromdichte von hTRPC3-E512Q in der Ganzzellkonfiguration ohne Histaminapplikation ermittelt. Abbildung 46 zeigt die Stromdichte beim Haltepotential von ± 60 mV.

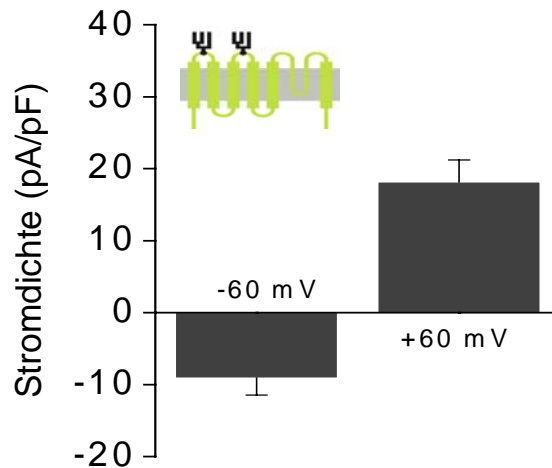


Abb. 43 Stromdichte von hTRPC3-E512N. Dargestellt ist die Einwärtsstromdichte der hTRPC3-Kationen-Kanäle bei einem Haltepotential von -60 mV sowie die Auswärtsstromdichte beim Haltepotential von $+60$ mV. Die gemittelten Werte von Messungen 21 des hTRPC3-E512N-Kanal-Protein exprimierender HEK293 Zellen gingen in diese Abbildung ein. Angaben als Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwertes. Zu sehen sind zudem die beiden extrazellulären Glykosylierungsstrukturen des hTRPC3-E512Q-Kanal-Proteins.

Bei einem Haltepotential von $+60$ mV betrug die Auswärtsstromdichte etwa $18,5 \pm 4,0$ pA/pF, bei -60 mV die Einwärtsstromdichte ca. $9,5 \pm 3,0$ pA/pF. Ein- und Auswärtsstromdichte waren signifikant ($p=0,027$) geringer als bei den hTRPC3-Kationen-Kanälen. Das Einfügen einer zusätzlichen Glykosylierungsstruktur hat bei den hTRPC3-Kationen-Kanälen eine Verringerung der Stromdichte hervorgerufen. Das gilt auch für die Basalaktivität, dargestellt in Abbildung 44. Bei einem Haltepotential von $+60$ mV betrug die Basalaktivität ca. $41,5 \pm 5,0\%$, bei -60 mV etwa $-29,5 \pm 4,0\%$ der maximalen Stromantworten unter Histaminapplikation (normiert auf 100%) und war damit größer als bei den hTRPC6-Kationen-Kanälen, aber signifikant kleiner ($p=0,046$) als bei den hTRPC3-Kationen-Kanälen. Verglichen mit den hTRPC3-Kanal-Proteinen, bildeten die hTRPC3-E512Q-Kationen-Kanälen also funktionelle Kanäle mit signifikant verringerter konstitutiver Aktivität. Auf Histaminapplikation ließen sich

3. Ergebnisse

ebenfalls maximale Stromantworten generieren. Die Veränderung des jeweiligen Glykosylierungsmusters beeinflusst anscheinend nicht die Aktivierbarkeit durch einen Agonisten. Alle Glykosylierungsmutanten bildeten weiterhin rezeptorgesteuerte Kationen-Kanäle.

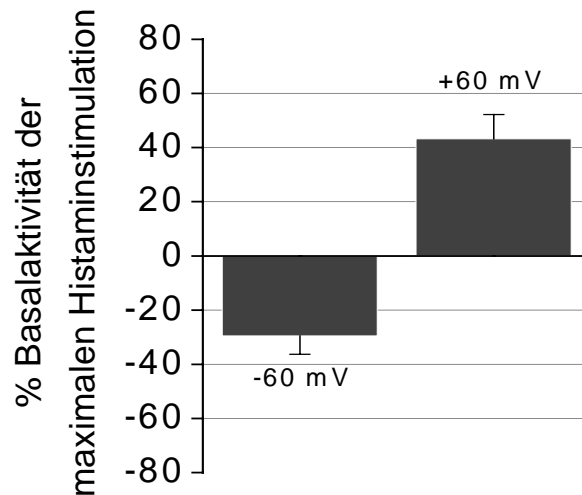


Abb. 44 Basalaktivität von hTRPC3-E512N. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Basalaktivität der hTRPC3-E512N-Kationen-Kanäle an der maximalen Stromantwort (normiert auf 100%) nach Histaminapplikation. Gemessen wurde bei einem Haltepotential von ± 60 mV. Angaben als Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwertes. Die Abbildung zeigt die gemittelten Werte von Messdaten sechs das hTRPC3-E512N-Kanal-Protein exprimierender HEK293 Zellen verwendet.

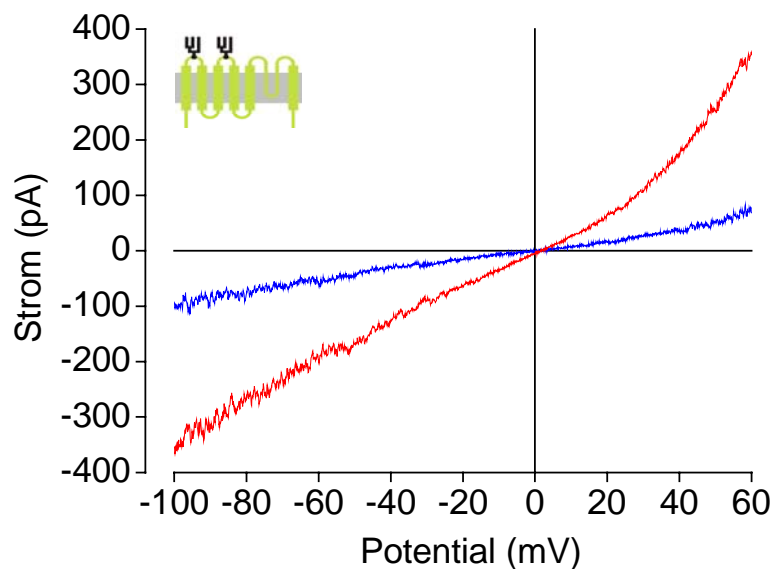


Abb. 45 Strom-Spannungskurve von hTRPC3-E512N. Dargestellt ist die Stromantwort der hTRPC3-E512N-Kationen-Kanäle, aufgetragen gegen das applizierte Potential. Die blaue Strom-Spannungsbeziehung zeigt die Stromantwort vor, die rote die Stromantwort nach Histaminapplikation. Die

3. Ergebnisse

Haltepotentiale lagen bei -100 mV bis $+60$ mV. Zudem ist die schematische Darstellung des Glykosylierungsmusters zu sehen.

Die hTRPC3-E512N-Kationen-Kanäle zeigten wie alle Wildtyp-Kanal-Proteine sowie deren Glykosylierungsmutanten sofort nach Histaminapplikation maximale Stromantworten. Eine Veränderung des Glykosylierungsmusters beeinflusst also nicht die Aktivierbarkeit durch Histamin. Betrachtet man den Kurvenverlauf, so lässt sich keine Veränderung der Auswärtsrektifizierung feststellen, wie dies bei den hTRPC6-Kationen-Kanälen und dessen Glykosylierungsmutanten der Fall war. Basalaktivität, maximale Stromantworten nach Histaminapplikation sowie Stromantworten nach Inaktivierung werden zusammenfassend gegen die Zeit aufgetragen und als Stromverlauf dargestellt, wie in Abbildung 46 zu sehen ist.

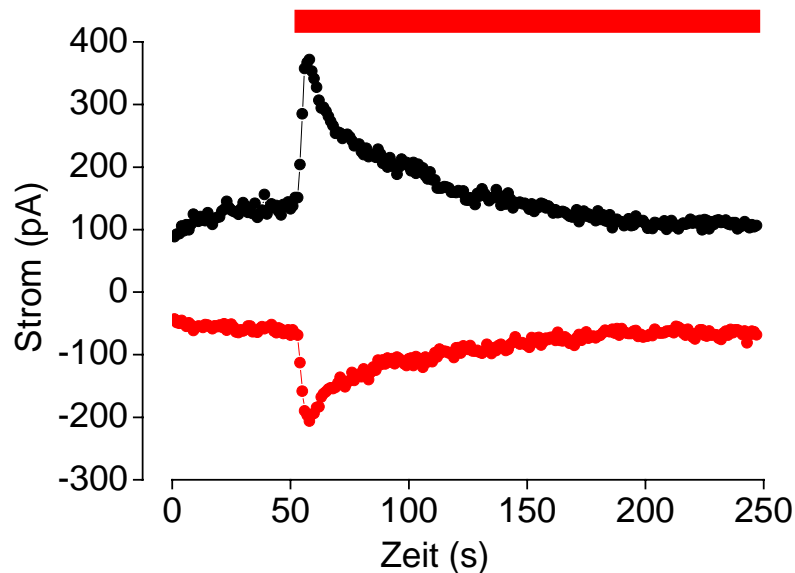


Abb. 46 Stromverlauf von hTRPC3-E512N. Dargestellt ist die Stromantwort der hTRPC3-E512N-Kationen-Kanäle, aufgetragen gegen die Zeit. Das rote Punkt-Linien-Diagramm zeigt den Einwärtsstrom, das schwarze den Auswärtsstrom. Aktiviert wurden hTRPC3-E512N-Kationen-Kanäle durch Histamin in maximaler Wirkkonzentration. Gemessen wurde bei Potentialbereichen von -100 mV bis $+60$ mV bis zum Erreichen der initialen Stromantworten (ca. 200 s). Der rote Balken stellt die Dauer der Histaminapplikation dar.

Histamin wurde nach ca. 40 s hinzugegeben und aktivierte die hTRPC3-E512N-Kationen-Kanäle sofort. Auch die hTRPC3-E512N-Kationen-Kanäle zeigten nach Inaktivierung wieder die initialen Stromantworten. Eine zusätzliche Glykosylierungsstruktur beim hTRPC3-Kanal-Protein führte zu einer Verringerung der konstitutiven Aktivität, eine Elimination des Glykosylierungsmusters beim hTRPC6-

Kanal-Protein dagegen zu einer Vergrößerung. Somit ist klar, dass das Glykosylierungsmuster die biophysikalischen Eigenschaften der hTRPC3,6,7-Subfamilie beeinflusst. Anhand der Glykosylierungsmutanten konnte gezeigt werden, dass hTRPC3 und hTRPC6 keineswegs funktionell redundant sind.

Zu Sicherung dieser These wird im Folgenden noch eine weitere elektrophysiologische Untersuchungsmethode Verwendung finden, die Einzelkanalkonfiguration. Mit deren Hilfe dieser *zellfreien* Methode werden biophysikalische Eigenschaften wie Offenwahrscheinlichkeit (über die Einzelkanalaktivität) und Leitfähigkeit analysiert werden. Die Ergebnisse stellen sich wie folgt dar.

3.3 Einzelkanalkonfiguration

Die Etablierung der Einzelkanalkonfiguration ist bereits beschrieben worden. Es ist zu erwarten, dass sich die biophysikalischen Eigenschaften der Mitglieder der hTRPC3/6/7-Subfamilie und deren Glykosylierungsmutanten nicht nur in der Ganzzellkonfiguration, sondern auch in der Einzelkanalkonfiguration unterscheiden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der „inside-out“-Konfiguration dargestellt. Sofern Ergebnisse der „outside-out“-Konfiguration berücksichtigt wurden, ist dies in den Abbildungen vermerkt worden. Die Aktivierung erfolgte nicht durch Histamin, sondern durch Zusatz von SAG. Die Stromantworten vor und während SAG-Applikation wurden durch Spannungsrampen von -60 mV bis +60 mV bei einer Frequenz von 1 Hz mit einem Anstieg von 20 mVs^{-1} erzielt und bei einer Frequenz von 5 kHz gefiltert. Nur Messungen mit einem elektrischen Rauschen („baseline noise“) unter 560 fA r.m.s. flossen in die Ergebnisse ein. Exemplarisch werden die Einzelkanalaktivität und daraus die Offenwahrscheinlichkeit sowie die Leitfähigkeit der hTRPC6-Kationen-Kanäle und dessen Glykosylierungsmutante hTRPC6-N561Q besprochen. Die Offenwahrscheinlichkeit (NPo) ist hier als Produkt der Anzahl aller funktionellen Kanäle des untersuchten Membranflecks und ihrer Offenwahrscheinlichkeit („open probability“) angegeben. Die Leitfähigkeit eines Ionenkanals gibt an, wie stark dieser Einzelkanal Ionen leitet.

3.3.1 hTRPC6

In der „inside-out“-Konfiguration wurden die Stromantworten von hTRPC6 unter Rezeptorstimulation mittels Zugabe von SAG ermittelt, wobei Potentiale von -60 bis $+60$ mV in Schritten von 20 mV gefahren wurden. Das Ergebnis wird in Abbildung 47 dargestellt.

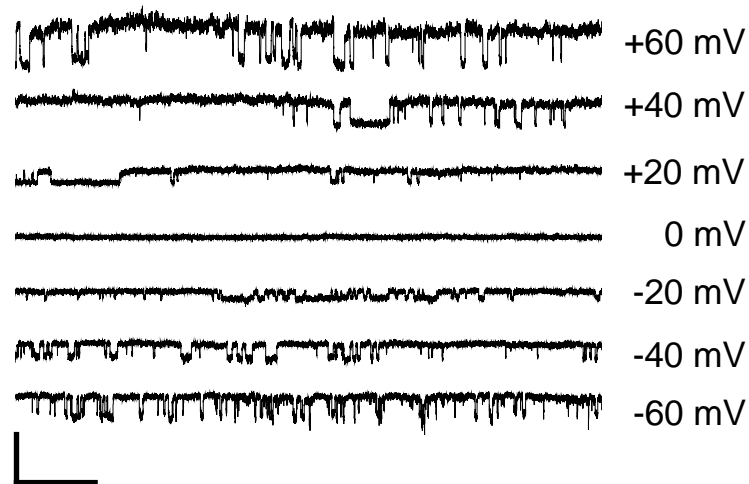


Abb. 47 Einzelkanalkonfiguration von hTRPC6: Dargestellt ist die gegen die Zeit aufgetragene Stromantwort eines hTRPC6-Kationen-Kanals unter Applikation von SAG, gemessen in der „inside-out“-Konfiguration. Übereinander stehen die gemessenen Einzelkanalantworten bei Potentialen von -60 mV bis $+60$ mV in 20 mV – Schritten. Die Applikationsdauer der verschiedenen Potentiale beträgt jeweils $1,5$ s. Die Skalierung beträgt 200 ms und 20 pA.

Bei steigenden Potentialen wird die Stromantwort der hTRPC6-Kationen-Kanäle größer. Bei $+60$ mV ist eine genaue Messung nicht möglich, da hier der notwendig hohe Abdichtwiderstand nicht gehalten werden kann und zu große Leckströme auftreten. Eine sichere Aussage über noch höhere Potentiale kann demzufolge nicht getroffen werden.

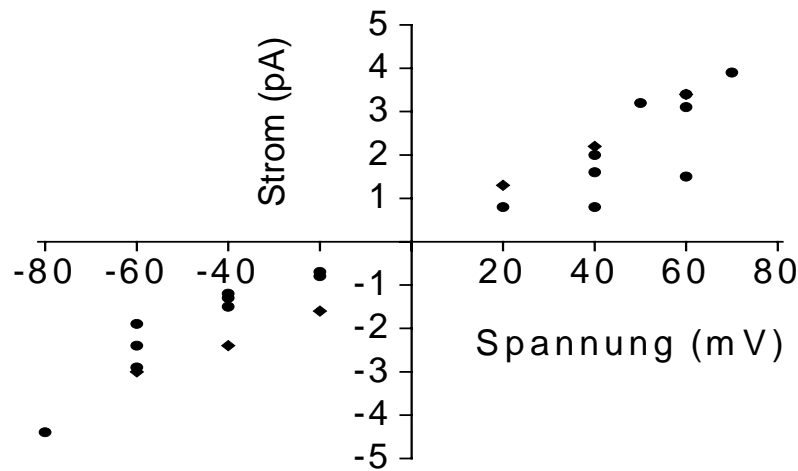


Abb. 48 Leitfähigkeit von hTRPC6. Dargestellt ist die Leitfähigkeit von hTRPC6 unter SAG-Applikation bei Potentialen von -80 mV bis $+80$ mV, wobei das Potential in Schritten von 20 mV gesteigert wurde. Die Leitfähigkeit beträgt nach Errechnung des Mittelwertes und Berücksichtigung seiner Standardabweichungen $54 \text{ pS} \pm 3 \text{ pS}$.

Bei steigendem Potential nahm die Leitfähigkeit der Einzelkanäle nahezu linear zu. Dies ist in Abbildung 51 zu erkennen. Die Leitfähigkeit der hTRPC6-Kationen-Kanäle betrug $54 \text{ pS} \pm 3 \text{ pS}$. Bei steigenden Potentialen konnte der notwendige Abdichtwiderstand nicht gehalten werden, so dass keine sichere Aussage gemacht werden konnte. Der Anstieg der Leitfähigkeit sowohl in positiver als auch in negativer Richtung änderte sich nicht. Wie es sich mit der Offenwahrscheinlichkeit (Wahrscheinlichkeit des Kanals in den offenen Zustand überzugehen) von hTRPC6 verhält, zeigt Abbildung 49.

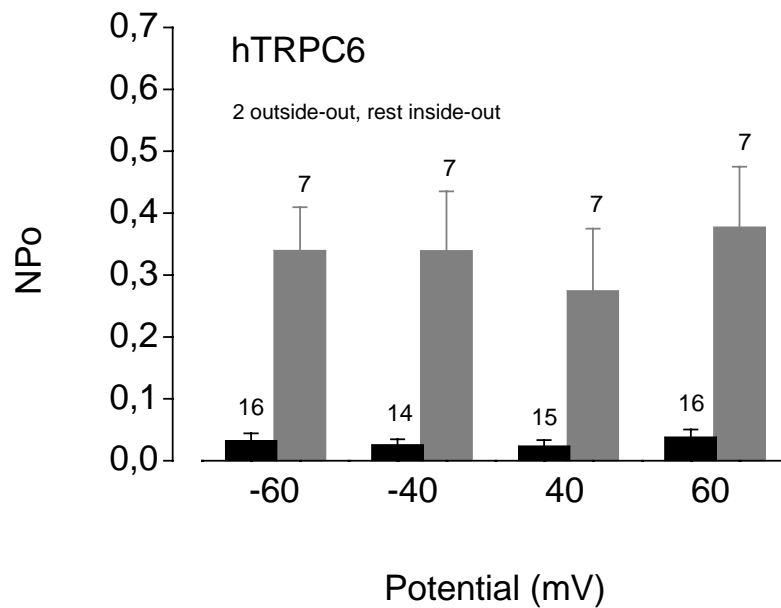


Abb. 49 Offenwahrscheinlichkeit von hTRPC6. Die Abbildung zeigt die Offenwahrscheinlichkeit der hTRPC6-Kationen-Kanäle vor Histaminapplikation bzw. Zugabe von SAG (schwarz) und unter Zufuhr von Histamin bzw. von SAG (grau). Gemessen wurde bei Potentialbereichen von -60 mV bis zu $+60$ mV in Schritten von 20 mV. ± 20 mV sowie 0 mV werden nicht dargestellt. Angaben als Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwertes. Für die Darstellung vor Rezeptorstimulation wurden 14 bis 16 Messungen verwendet, für die Abbildungen während Rezeptorstimulation sieben.

Ohne Histaminzufuhr lag die Offenwahrscheinlichkeit bei den verschiedenen Potentialen annähernd bei etwa $0,03 \pm 0,01$, steigt dagegen unter Histaminapplikation auf Werte von maximal $0,37 \pm 0,08$ an. Die hTRPC6-Kationen-Kanäle zeigten erst unter Anwesenheit eines Agonisten eine hohe Offenwahrscheinlichkeit. Wird die Basalaktivität als prozentualer Anteil an der maximalen Stromantwort dargestellt, so beträgt sie $-8,2\%$ der maximalen Stromantwort (normiert auf 100%) bei -60 mV bzw. $6,4\%$ bei $+60$ mV.

3.3.2 hTRPC6-N561Q

Die Stromantworten der hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle wurden ebenfalls in der „inside-out“-Konfiguration ermittelt, wobei Potentiale von -60 bis $+60$ mV in Schritten 20 mV appliziert wurden.

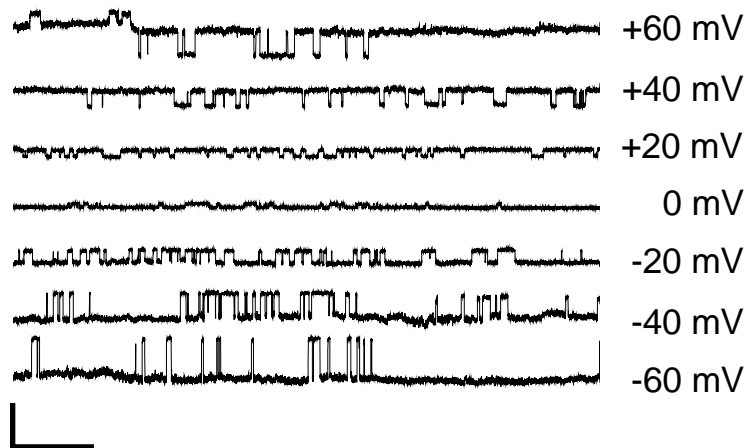


Abb. 50 Einzelkanalkonfiguration von hTRPC6-N561Q. Die Abbildung zeigt die gegen die Zeit aufgetragenen Stromantworten unter SAG-Applikation in der „inside-out“-Konfiguration der hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle bei Potentialen von –60 mV bis +60 mV, gesteigert in Schritten zu 20 mV. Die Applikationsdauer der verschiedenen Potentiale dauerte jeweils 1,5 s. Die Skalierung beträgt 200 ms und 20 pA.

Wie Abbildung 50 verdeutlicht, vergrößerte sich bei steigenden Potentialen die Stromantworten. Auch hier nahm bei steigenden Potentialen der Abdichtwiderstand ab und die Leckströme zu, so dass in diesen Bereichen keine sicheren Aussage getroffen werden konnte. Wird die Basalaktivität als prozentualer Anteil der maximalen Stromantwort nach Zugabe von SAG angegeben, lassen sich folgende Aussagen treffen. Die hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle wiesen eine Basalaktivität von -42,4% der maximalen Stromantwort (normiert auf 100%) bei –60 mV bzw. 43,4% bei +60 mV auf. Die hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle unterschieden sich darin signifikant ($p < 0,05$) von den hTRPC6-Kationen-Kanäle. Die Auswirkung auf die Leitfähigkeit, zeigt Abbildung 51. Ohne SAG-Applikation betrug die Leitfähigkeit der hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle etwa $186 \text{ pS} \pm 6 \text{ pS}$ und war damit signifikant größer als die Leitfähigkeit der hTRPC6-Kationen-Kanäle.

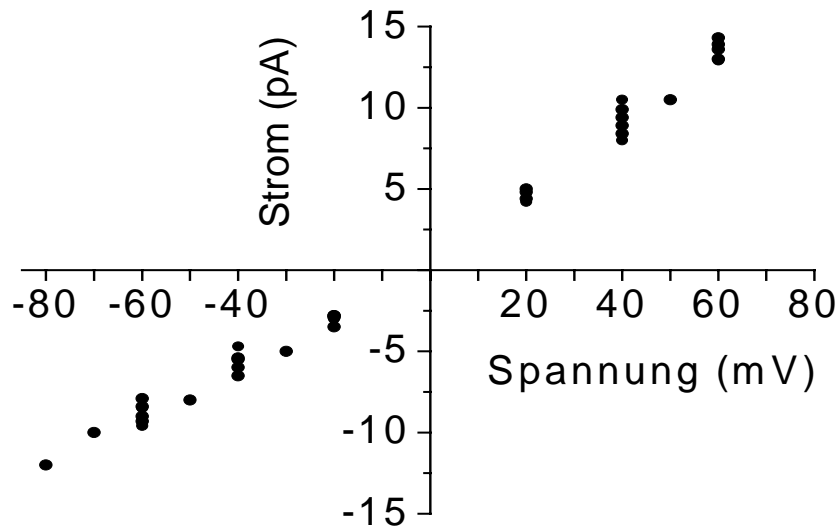


Abb. 51 Leitfähigkeit von hTRPC6-N561Q. Dargestellt ist die Leitfähigkeit von hTRPC6-N561Q ohne SAG-Zufuhr. Gemessen wurde bei Potentialen von -60 mV bis zu $+60$ mV, wobei in Schritten von 20 mV vorgegangen wurde. Die Leitfähigkeit beträgt etwa $186 \text{ pS} \pm 6 \text{ pS}$.

Die Leitfähigkeit der hTRPC6-Kationen-Kanäle ist in Abbildung 48 dargestellt. Als letzte biophysikalische Eigenschaft wird im Folgenden die Offenwahrscheinlichkeit der hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle analysiert (Abbildung 52).

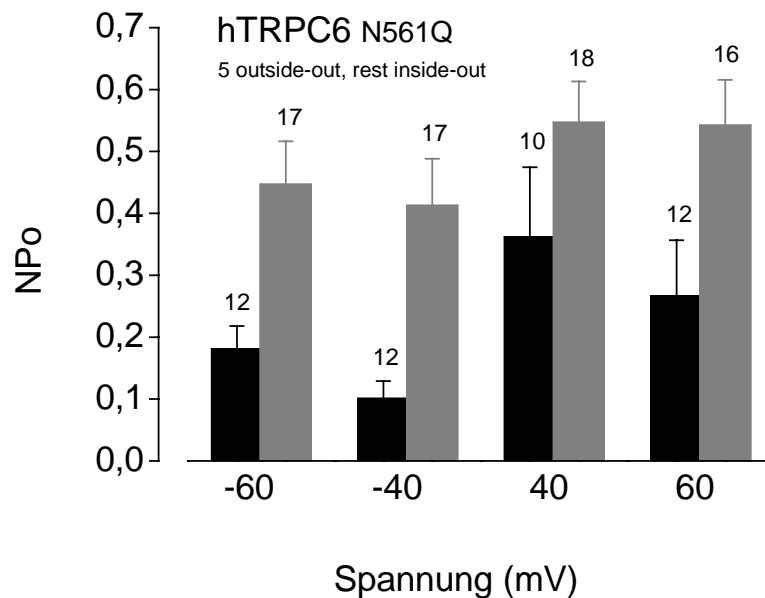


Abb. 52 Offenwahrscheinlichkeit von hTRPC6-N561Q. Die Abbildung zeigt die Offenwahrscheinlichkeit der hTRPC6-Kationen-Kanäle vor Histaminapplikation bzw. Zugabe von SAG (schwarz) und unter Zufuhr von Histamin bzw. von SAG (grau). Gemessen wurde bei Potentialen von -60 mV bis zu $+60$ mV in Schritten von 20 mV. ± 20 mV sowie 0 mV werden nicht dargestellt. Angaben als

3. Ergebnisse

Mittelwert mit der Standardabweichung des Mittelwertes. Für die Darstellung vor Rezeptorstimulation wurden 10 bis 12 Messungen verwendet, für die Abbildungen während Rezeptorstimulation 16 bis 18.

Die hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle zeigten ohne Zusatz von Histamin eine Offenwahrscheinlichkeit von etwa $0,09 \pm 0,05$ (bei -40 mV) bis ca. $0,35 \pm 0,08$ (bei $+40$ mV). Unter Zufuhr von SAG stieg die Offenwahrscheinlichkeit auf Werte von $0,38 \pm 0,05$ (bei -40 mV) bis $0,55 \pm 0,07$ mV (bei $+40$ mV) an. Ohne Aktivierung durch SAG-Applikation zeigten die hTRPC6-N561Q-Kationen-Kanäle eine signifikant größere Offenwahrscheinlichkeit als die hTRPC6-Kationen-Kanäle. Die hTRPC6-N561Q-Kanal-Proteine bilden demzufolge funktionelle Kationen-Kanäle, die ohne Agonistenapplikation eine signifikant größere konstitutive Aktivität als die hTRPC6-Kationen-Kanäle aufwiesen. Dieselben Resultate konnten bereits in der Ganzzellkonfiguration gezeigt werden. Mittels zwei unterschiedlichen elektrophysiologischen Methoden konnte demnach gezeigt werden, dass Glykosylierung die biophysikalischen Eigenschaften der Mitglieder der hTRPC3,6,7-Subfamilie bestimmt. hTRPC3 und hTRPC6 sind funktionell nicht redundant, sondern werden in ihrer Aktivierung unterschiedlich reguliert. Es ist wahrscheinlich, dass sie demzufolge verschiedene zelluläre Aufgaben wahrnehmen.

4. Diskussion

Die Mitglieder der TRPC3,6,7-Subfamilie gehören zu den rezeptorgesteuerten oder speichergesteuerten Kanal-Proteinen. Sie können durch DAG aktiviert werden (Hofmann et al., 1999) und bilden mit sich selbst *homotetramere* oder untereinander *heterotetramere* funktionelle Kationen-Kanäle, nicht aber mit Vertreter anderer TRPC-Subfamilien (Hofmann et al., 2002). Es stellte sich die Frage, ob hTRPC3, hTRPC6 sowie hTRPC7 (in den hier vorliegenden Untersuchungen wurde m(Maus)TRPC7 verwendet) als Mitglieder der hTRPC3,6,7-Subfamilie funktionell redundant sind oder unterschiedliche zelluläre Funktionen aufweisen. Zudem sollte geklärt werden, ob das Glykosylierungsmuster biophysikalische Eigenschaften definiert und somit die Funktion der untersuchten Kanal-Proteine bestimmt. Die vorliegende Arbeit erbrachte den Nachweis, dass hTRPC3 und hTRPC6 funktionell nicht redundant sind, sondern unterschiedliche zelluläre Funktionen besitzen müssen. Für diesen Nachweis wurden die biophysikalischen Eigenschaften der Wildtyp-Kanalproteine hTRPC3 und hTRPC6 vor und nach Veränderung ihres Glykosylierungsmusters analysiert.

Mittels Patch-Clamp-Technik in der Ganzzell- und Einzelkanalkonfiguration wurden die biophysikalischen Eigenschaften sowohl der Wildtyp-Kanalproteine hTRPC3, hTRPC6 als auch ihrer Glykosylierungsmutanten untersucht. hTRPC6 bildet funktionelle Kationen-Kanäle mit geringer konstitutiver Aktivität. Erst nach Zugabe eines Agonisten in maximaler Wirkkonzentration (hier 100 μ M Histamin) wird eine maximale Aktivierung erreicht. Dem gegenüber besitzen die von hTRPC3 gebildeten Kationen-Kanäle eine hohe konstitutive Aktivität. hTRPC3 und hTRPC6 müssen demzufolge einer unterschiedlichen Regulierung unterliegen und verschiedene zelluläre Funktionen besitzen.

Nun stellte sich die Frage, wie zwei aufgrund ihrer Sequenzhomologie so nahe verwandte Kanal-Proteine unterschiedliche Funktionen ausüben können. Vannier et al. (1998) hatten den Nachweis erbracht, dass hTRPC3 nur eine extrazelluläre Glykosylierungsstelle aufweist. hTRPC6 besaß dagegen zwei extrazelluläre Glykosylierungsstellen. Die Glykosylierungsmuster von hTRPC6 sind nicht nur in heterologen Zellsystemen nachgewiesen worden, sondern auch für hTRPC6-Kanal-Proteine in glatten Muskelzellen der Lungengefäße (Yu et al., 2003). Man nahm an, dass das extrazelluläre Glykosylierungsmuster biophysikalische Eigenschaften der

Kanal-Proteine und letztlich die Funktion der Kationen-Kanäle bestimmt. Durch Erschaffen von Glykosylierungsmutanten sowie Untersuchungen ihrer biophysikalischen Eigenschaften wurde diese Annahme bestätigt.

4.1 Zellkultur und Transfektion

Zur Verwendung kamen HEK293 Zellen, eine Zelllinie aus menschlichen embryonalen Nierenzellen („human embryonic kidney cells“). HEK293 Zellen ließen sich einfach kultivieren und eigneten sich gut für Messungen mit der Patch-Clamp-Methode. Der Transfektionsvorgang wurde bereits ausführlich erläutert. Eine erfolgreiche Transfektion ließ sich einerseits am Fluoreszenzmuster der Zelle unter dem konfokalen Mikroskop, andererseits an ausreichenden Stromantworten erkennen. Durch konfokale Mikroskopie unter Verwendung des pEGFP („enhanced green fluorescens protein“) als Koexpression sowie immunhistochemische Untersuchungen (Dietrich et al., 2003) konnte der Einbau von hTRPC3, hTRPC6 und hTRPC7 sowie ihrer Glykosylierungsmutanten in die Zellmembran nachgewiesen und kontrolliert werden. Die Expression der Glykosylierungsmutanten scheint dabei geringer zu sein als bei den Wildtyp-Kanal-Proteine. Das Fluoreszenzmuster der Glykosylierungsmutanten auf der Zellmembran besitzt nach 24 bis 48 Stunden eine geringere Ausprägung. Dies bestätigten zudem die geringen Stromantworten von HEK293 Zelle, die Glykosylierungsmutanten exprimierten. Die Transfektionsdauer der Glykosylierungsmutanten beträgt für ausreichende Stromantworten etwa 48 bis 72 Stunden. Diese Zeitspanne wurde empirisch ermittelt.

4.2 Messung

Angewendet wurde die Patch-Clamp-Methode in der Ganzzell- und in der Einzelkanalkonfiguration. Gemessen wurden die Wildtyp-Kanal-Proteine nach 24 bis 48 Stunden, die Glykosylierungsmutanten erst nach 48 bis 72 Stunden. Die Vorbereitungen zum Messvorgang waren standardisiert und sind bereits erläutert worden. HEK293 Zellen, die Glykosylierungsmutanten exprimiert hatten, erwiesen sich als schwieriges Messobjekt. Dies mag an der langen Transfektionszeit liegen. Die HEK293 Zellen sind beim Messvorgang bereits bis zu 72 Stunden alt. Die Zellmembran besitzt zu diesem Zeitpunkt eine verringerte Flexibilität und reißt beim

Versuch, einen ausreichend hohen Abdichtwiderstand zu etablieren, viel häufiger ein. Problematisch erwies sich die verringerte Membranflexibilität bei der zellfreien Einzelkanalkonfiguration. Erfolgreich einen Membranfleck aus der Zellmembran herauszureißen, erforderte bei den Glykosylierungsmutanten eine bedeutend höhere Anzahl an Messversuchen. Ob der Einbau der Glykosylierungsmutanten selbst die Zellmembran in ihrer Flexibilität beeinträchtigt, ist strittig, denn nach 24 bis 48 h zeigen alle HEK293 Zellen eine gleich gute Flexibilität. Allerdings sind zu diesem Zeitpunkt erst wenige Glykosylierungsmutanten in die Zellemembran eingebaut worden.

Ein weiterer Unterschied besteht im eigentlichen Messvorgang. Nach Applikation höherer Haltepotentiale erwiesen sich Glykosylierungsmutanten exprimierende HEK293 Zellen als instabil. Dies gilt auch für den herausgerissenen Membranfleck in der zellfreien Einzelkanalableitung. Eine Aktivierung durch Zufuhr eines Agonisten in maximaler Wirkkonzentration führte oft zur Zerstörung der HEK293 Zelle. Aus diesem Grunde sind Aussagen zur Stromantwort bei hohen Potentialen strittig. Dies gilt auch für die Inaktivierung. Bei den Wildtyp-Kanal-Proteinen wurden nach Inaktivierung wieder die initialen Stromantworten gemessen. HEK293 Zellen, die Glykosylierungsmutanten exprimieren, sind oftmals zu instabil, um zu den initialen Stromantworten nach Inaktivierung zurückzukehren. Die Stromantworten nach Inaktivierung entsprechen allerdings nahezu den Stromantworten vor Aktivierung.

4.3 Glykosylierung bestimmt Funktion und Oberflächenexpression

Die elektrophysiologischen Untersuchungen charakterisieren hTRPC6 als einen Kationen-Kanal mit niedriger konstitutiver Aktivität. hTRPC3 besitzt eine fast 5fach höhere Basalaktivität. Diese Ergebnisse wurden mittels Fluoreszenzmessung unter Verwendung von Mangan („Mangan-Quench“) bestätigt (Dietrich et al., 2003). Gemeinsam ist beiden Kanal-Proteinen, dass durch Agonistenapplikation in maximaler Wirkkonzentration (100 μ M Histamin bzw. 100 μ M Carbachol) eine maximale Stromantwort hervorgerufen werden kann. Wenn zwei Mitglieder der gleichen TRPC-Subfamilie unterschiedliche konstitutive Aktivitäten besitzen, sind sie funktionell nicht redundant, sondern müssen verschiedene zelluläre Funktionen ausüben. Im Vordergrund stand nun die Frage, welche Strukturen bei so hoher Sequenzhomologie

innerhalb der hTRPC3,6,7-Subfamilie die unterschiedliche konstitutive Aktivität definieren. Wie vorher erwähnt, besitzt hTRPC3 eine und hTRPC6 zwei extrazelluläre Glykosylierungsstellen. Es war bislang ungeklärt, ob eine Veränderung des extrazellulären Glykosylierungsmusters die biophysikalischen Eigenschaften beeinflusst. Wenn dies zuträfe, dann wäre klar, dass Glykosylierung eine hohe bzw. niedrige konstitutive Aktivität definiert.

Unter dieser Fragestellung wurden zunächst aus hTRPC6 nach Entfernen einer, dann beider extrazellulären Glykosylierungsstrukturen die Glykosylierungsmutanten hTRPC6-N473Q, hTRPC6-N561Q und hTRPC6-N473Q-N561Q erschaffen. hTRPC6-N473Q besaß zum Einen eine sehr große Instabilität während des Messvorgangs, zum Anderen ließen sich nach Agonistenapplikation keine Stromantworten generieren. Dies legt die Vermutung nahe, dass hTRPC6-N473Q eventuell keine funktionellen Kationen-Kanäle bilden kann. hTRPC6-N561Q und in größerem Ausmaß hTRPC6-N473Q-N561Q zeigten eine signifikant höhere konstitutive Aktivität als hTRPC6. Dagegen wies hTRPC3-E512N, die Glykosylierungsmutante von hTRPC3, eine signifikant kleiner Basalaktivität als hTRPC3 auf. Auch hier wurden die Ergebnisse mittels Mangan-Quench-Methode verifiziert (Dietrich et al., 2003). Unter Agonistenapplikation ließen sich ebenfalls maximale Stromantworten generieren. Alle hTRPC-Kanal-Proteine zeigten nach Inaktivierung wieder die initialen Stromantworten. Eingeschränkt gilt dies für die Glykosylierungsmutanten, wie zuvor erläutert wurde. Innerhalb der hTRPC3,6,7-Subfamilie werden biophysikalischen Eigenschaften durch das extrazelluläre Glykosylierungsmuster bestimmt. Sieht man sich die Expression der Glykosylierungsmutanten in der Zellmembran an, so zeigten sie nach 24 bis 48 Stunden eine geringere Oberflächenexpression auf als die Wildtyp-Kanal-Proteine. Eine ausreichende Oberflächenexpression war erst nach 48 bis 72 Stunden erreicht. Dies legt die Vermutung nahe, dass Glykosylierung neben biophysikalischen Eigenschaften auch die Oberflächenexpression und Assemblierung zu funktionstüchtigen Kationen-Kanälen reguliert. Dies steht im Gegensatz zu der von Dietrich et al. (2003) getroffenen Aussage, dass die Glykosylierung von hTRPC3 und hTRPC6 die Oberflächenexpression sowie die Assemblierung zu funktionstüchtigen Kationen-Kanälen nicht beeinflussen würde. Wenn dies zuträfe, müsste hTRPC6-N473Q nach Aktivierung eine Stromantwort zeigen.

Der Einfluss des Glykosylierungsmusters ist kein Phänomen der hTRPC3,6,7-Subfamilie allein. Eine Reihe von Rezeptoren und Kanal-Proteinen werden maßgeblich

durch Glykosylierung in ihrer Funktion, Oberflächenexpression und Assemblierung definiert.

Als Beispiel seien die β_1 -Integrine aufgeführt. Je nach Funktion weisen β_1 -Integrine eine unterschiedliche Glykosylierung auf (Bellis, 2004). Integrine sind Transmembranproteine, die sowohl Kontakt zwischen benachbarten Zellen herstellen als auch als Rezeptoren für die Signalübermittlung verantwortlich sind. Sie steuern maßgeblich Prozesse wie Embryogenese, Wundheilung oder Tumorentstehung (Damsky et al., 2002; Miranti et al., 2002; Schwartz et al., 2002; Giancotti et al., 1999). Integrine sind transmembranöse, heterodimere Glykoproteine, die aus einer α - und β -Untereinheit bestehen. Es gibt verschiedene Arten von α - und β -Untereinheiten, deren Zusammensetzung zu unterschiedlichen Integrinen führen. Allein die β_1 -Integrine können 12 verschiedene α -Untereinheiten aufweisen (Hynes, 2002). Die β_1 -Integrine liegen im ER zunächst als ein Pool aus teilweise glykosylierten Proteinen vor. Aus diesem Pool werden unter weiteren Glykosylierungen funktionsfähige β_1 -Integrine gefertigt (Heino et al., 1989; Lenter et al., 1994; Akiyama et al., 1987; Jaspers et al., 1988). β_1 -Integrinen weisen eine N-Glykosylierung auf. Greift man in den Glykosylierungsprozess ein, werden Funktion und letztlich Wirkung der β_1 -Integrine verändert (Bellis, 2004). Ein fehlerhafter Glykosylierungsprozess kann sich in einer fehlerhaften Ausbildung eines festen Zellverband der epidermalen Keratinozyten (Kim et al., 1992) sowie in einer gestörten Ausreifung der Thymozyten im Thymus (Wadsworth et al., 1993) zeigen. Weitere Untersuchungen postulierten die Hypothese, dass β_1 -Integrine erst durch unterschiedliche Glykosylierung in ihrer Funktion gesteuert werden. Der Verlust von Glykosylierungsstrukturen ist z.B. vergesellschaftet mit einer malignen Transformation, erhöhter Invasivität und unreguliertem Wachstum (Dennis et al., 1999; Hakamori et al., 2002; Varki et al., 1999; Gorelik et al., 2001; Dall'Olio et al., 2001; Scanlin et al., 2000; Alper et al., 2003).

Untersuchungen zu Auswirkungen einer veränderten Glykosylierung bei *spannungsgesteuerten Kalium-Kanälen* wie *Kv1.4* und *Kv1.1* weisen ebenfalls einen Einfluss auf Funktion sowie Oberflächenexpression nach. Die spannungsgesteuerten Kalium-Kanäle Kv1.1 und Kv1.4 sind Glykoproteine der Zellmembran und an der Repolarisation des Aktionspotentials beteiligt. Sie sind als Homo- oder Heterotetramere angeordnet (Jan et al., 1997; Coetzee et al., 1999; Hille, 2001). Wie Abbildung 53 zeigt, besitzen die spannungsgesteuerten Kalium-Kanäle sechs Transmembrandomänen und weisen eine N-Glykosylierung auf, die sich auf der extrazellulären Schleife zwischen

erster und zweiter Transmembrandomäne befindet (Stühmer et al., 1989). Eine Fehlen dieser einen Glykosylierungsstruktur bewirkt beim spannungsgesteuerten Kalium-Kanal Kv1.4 eine herabgesetzte Proteinstabilität und eine herabgesetzte Expression in der Zellmembran durch ein Verbleiben im ER. Nach Entfernen der Glykosylierungsstruktur zeigt der spannungsgesteuerte Kalium-Kanal Kv1.1. dieses Verhalten nicht. Die Expression von Kv1.1 in der Zellmembran wird nicht oder nur gering beeinflusst (Watanabe et al., 2003).

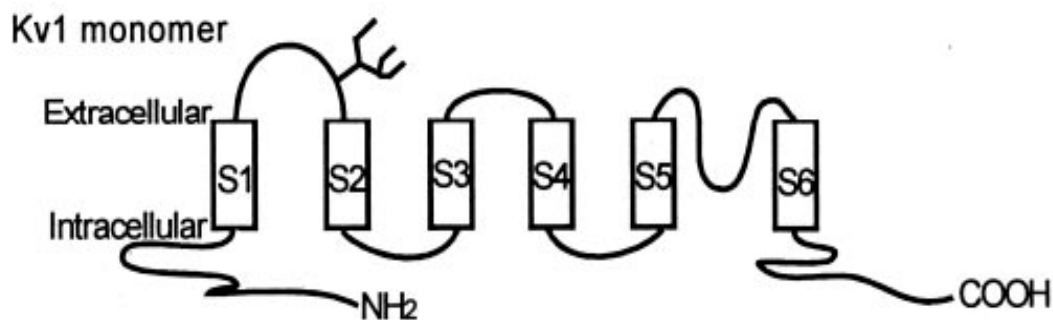


Abb. 53 Aufbau der Kalium-Kanal-Untereinheit Kv1.1: Dargestellt ist der Aufbau der Kalium-Kanal-Untereinheit von Kv1.1 (**Kv1 monomer**). Zu sehen sind die sechs Transmembrandomänen **S1 – S6** sowie die Glykosylierung als Glykosylierungsbäumchen auf der extrazellulären Seite (**extracellular**) zwischen S1 und S2. Dargestellt sind zudem der Amino- (**NH₂**-) und der Carboxyl- (**COOH**-) Terminus, jeweils auf der intrazellulären Seite (**intracellular**) (Abbildung aus Watanabe et al., 2003, Glycosylation affects the protein stability and cell surface expression of Kv1.4 but not Kv1.1 potassium channels, Journal of Biological Chemistry, 279, 8879 – 85).

Betrachtet man die Auswirkungen eines veränderten Glykosylierungsmusters beim humanen *Angiotensin-II-Rezeptor Typ I* (*hAT₁*), so werden auch hier Funktion und Oberflächenexpression durch Glykosylierung bestimmt. Wie in Abbildung 54 dargestellt, besteht *hAT₁* aus sieben Transmembrandomänen mit drei extrazellulären Schleifen (*ECL*) sowie einer intrazellulären Schleife (*ICL*). *hAT₁* gehört zu den *G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR)* und ist für die Regulation des Blutdrucks, des Salz- und Wasserhaushalts sowie für die Myoproliferation verantwortlich (de Gasparo et al., 2000). Veränderungen der Glykosylierung zeigen Auswirkungen auf Funktion und auf die Oberflächenexpression von *hAT₁*. Es kommt allerdings darauf an, welche extrazelluläre Schlinge (*ECL*) in ihrem Glykosylierungsmusters verändert wird.

Nach Anbringen einer zusätzlichen Glykosylierung auf der ersten extrazellulären Schlinge (*ECL1*) lässt sich eine deutlich herabgesetzte Affinität von *hAT₁* zu seinem Liganden feststellen. Zudem weist *hAT₁* nun eine geringere Oberflächenexpression auf (Lancot et al., 1999). Ändert man die Glykosylierung der

zweiten extrazellulären Schlinge (*ECL2*), zeigt hAT_1 ebenfalls eine verminderte Affinität zu seinem Liganden, ist aber verglichen mit dem hAT_1 -Wildtyp unverändert in der Zellmembran exprimiert (Jayadev et al., 1999, Deslauriers et al., 1999). Wird zuletzt die Glykosylierung der dritten extrazellulären Schleife (*ECL3*) verändert, resultiert daraus ein hAT_1 mit unveränderter Funktion, allerdings mit verminderter Oberflächenexpression (Lancôt et al., 2005).

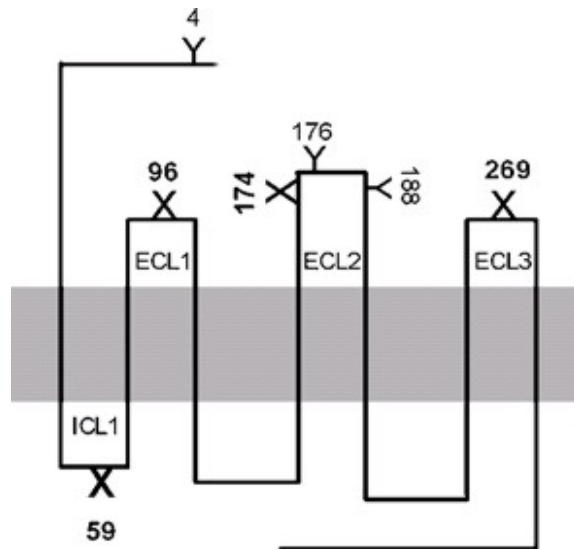


Abb. 54 Struktur des humanen Angiotensin-II-Typ 1-Rezeptors (hAT_1): Dargestellt ist der schematische Aufbau des humanen Angiotensin-II-Typ 1-Rezeptors (hAT_1). Der Rezeptor besteht aus sieben Transmembrandomänen und drei extrazellulären Schleifen (*ECL1 – 3*) sowie drei intrazellulären Schleifen, wovon die erste gekennzeichnet ist (*ICL1*). Ferner sind die verschiedenen Glykosylierungsstellen als Aminosäureposition zu erkennen (z.B.: 4, 59,..., 269), wobei Y eine natürliche Glykosylierungsstruktur darstellt und X eine künstlich eingeführte (Abbildung aus Lancôt et al., 2005, Importance of N-glycosylation positioning for cell-surface expression, targeting, affinity and quality control of the human AT_1 receptor, Biochem. Journal, 390, 367 – 76).

Nicht nur Rezeptoren für Proteine oder biogene Amine, sondern auch Rezeptoren für Lipide weisen eine Glykosylierung auf, die ihre biophysikalischen Eigenschaften bestimmt. Zu diesen Lipiden zählen unter Anderem die Sphingolipide. Ein Vertreter der Sphingolipide ist das *Sphingosin-1-Phosphat* (*Sph-1-P*), das aus Sphingosin, einem Metabolit des *Sphingomyelins*, mittels Phosphorylierung durch die *Sphingosinkinase* entsteht (Stoffel, 1970; Stoffel et al., 1974; Olivera et al., 1998; Huwiler et al., 2000). Der Rezeptor für Sphingosin-1-phosphat ist ein Produkt des *Endothel-Differenzierung-Gens* (*Edg*), gehört zu den *G-Protein gekoppelten Rezeptoren* (GPCR) und weist sieben Transmembrandomänen auf (Yatomi et al., 1995; Igarashi et al., 1998; Kluk et al., 2002). Sph-1-P lässt sich in Thrombozyten nachweisen und wird bei deren Aktivierung freigesetzt (Yatomi et al., 1997). Sph-1-P ist an der

Regulierung diverser Zellprozesse beteiligt wie Zellbewegungen, Proliferation und Kontraktion der glatten Muskelzellen (Igarashi et al., 1997; Spiegel et al., 2000).

Der Rezeptor für Sph-1-P weist an seinem N-Terminus eine Glykosylierungsstruktur auf. Es liegt eine N-Glykosylierung vor. Verändert man die Glykosylierungsstruktur dieses Rezeptors, so lassen sich eine veränderte Oberflächenexpression sowie veränderte Affinität zu seinem Liganden Sph-1-P feststellen, wie im Folgenden erläutert wird. Wie Abbildung 53 darstellt, wird der Rezeptor für Sph-1-P nach Glykosylierung im Golgi-Apparat in der Zellmembran eingebaut. Dabei kommt Sph-1-P in bestimmten Arealen der Zellmembran (*microdomain*) vor, zu Clustern angeordnet (*lateral movement*). Diese Cluster bedingen die Affinität des Rezeptors zu Sph-1-P. Nach Binden von Sph-1-P an diese Cluster wird dieser aktivierte *Sph-1-P-Rezeptor-Komplex* internalisiert (*internal movement*). Dadurch kann der Rezeptor für Sph-1-P wieder recycelt werden.

Wie Abbildung 55 zeigt, bewirkt eine Änderung der Glykosylierung am N-Terminus eine Aufhebung des „lateral movement“. Der Rezeptor für Sph-1-P kann nicht mehr in Clustern vorliegen. Seine Affinität zu Sph-1-P ist verringert. Es entstehen weniger Sph-1-P-Rezeptor-Komplexe, die internalisiert werden können. Letztlich ist die Resensitivierung des Rezeptors von Sph-1-P deutlich verringert, die Aktivierbarkeit vermindert (Kohno et al., 2004).

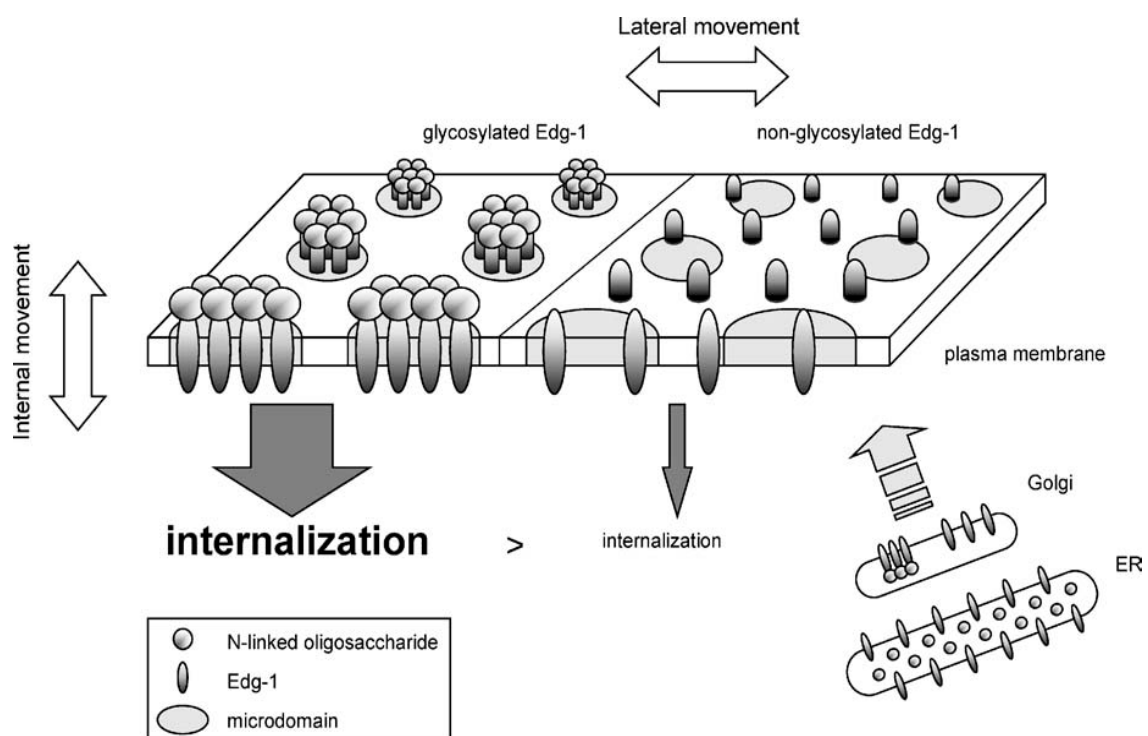


Abb. 55 Internalisierung der Rezeptoren für Sphingosin-1-phosphat: Dargestellt ist die von der Glykosylierung abhängige Internalisierung des Rezeptors für Sphingosin-1-phosphat. Der Rezeptor ist ein Produkt des Endothelial-Differenzierung-Gens 1 (**Edg-1**), das im endoplasmatischen Reticulum (**ER**) synthetisiert und im Golgi-Apparat (**Golgi**) glykosyliert wird. Nicht glykosylierte Mutanten von Edg-1 (**non-glycosylated Edg-1**) bilden keine Cluster mehr in bestimmten Areale der Zellmembran (**plasma membrane**), als **microdomain** bezeichnet. Glykosyliertes Edg-1 (**glycosylated Edg-1**) bildet dagegen Cluster aus (**lateral movement**). Nach Binden von Sphingosin-1-phosphat an **Edg-1** wird der aktivierte Rezeptor-Ligand-Komplex internalisiert (**internal movement**) (Abbildung aus Kohno et al., 2004, Roles for N-glycosylation in the dynamics of Edg-1/S1P1 in sphingosine 1-phosphate-stimulated cells, Glycoconjugate Journal, 21: 497 – 501).

Die Glykosylierung bestimmt nicht nur die biophysikalischen Eigenschaften von *G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR)* sondern auch von *ionotropen Kanälen*. Dazu gehört beispielsweise der *5-HT_{3A} Rezeptor*, der zu den Kationen leitenden Kanälen zählt und ein Rezeptor für *5-Hydroxytryptamin (5-HT)* darstellt. 5-Hydroxytryptamin (5-HT), auch als *Serotonin* bezeichnet, zählt zu den *biogenen Aminen*. Biogene Amine sind Neurotransmitter, die wichtige physiologische und kognitive Funktionen des zentralen Nervensystems steuern. Insgesamt existieren neben dem 5-HT_{3A} Rezeptor 14 verschiedene Rezeptoren für Serotonin (Barnes et al., 1999). Außer dem 5-HT_{3A} Rezeptor gehören alle Rezeptoren für Serotonin zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Zu den ionotropen Kanälen zählt außer dem 5-HT_{3A} Rezeptor unter Anderem der nikotinerge Acetylcholin Rezeptor (nACh-R), der Glycin Rezeptor sowie der γ -Aminobuttersäure Rezeptor (GABA_A-R) (Reeves et al., 2002). Der 5-HT_{3A} Rezeptor kommt im peripheren und zentralen Nervensystem vor (Kidd et al., 1993; Tecott et al., 1995; Morales et al., 1998). 5-HT_{3A} besteht aus fünf Untereinheiten, die ein Homopentamer bilden. N-terminal sind drei extrazelluläre Glykosylierungsstrukturen vorhanden. Es liegt eine N-Glykosylierung vor. Eine Veränderung dieser Glykosylierungsstrukturen beeinflusst sowohl die Oberflächenexpression des Rezeptors als auch dessen Affinität zum Liganden. Wird die erste der drei Glykosylierungsstrukturen verändert, kommt es zu einer fehlerhaften Anordnung der einzelnen Untereinheiten. Dadurch verringert sich die Affinität des Rezeptors zum Liganden. Nach Veränderung der zweiten und dritten Glykosylierungsstruktur kommt es zu einer verminderten Oberflächenexpression. Hierbei wird die Affinität zum Liganden allerdings nicht beeinflusst. Allerdings zeigen alle drei Glykosylierungsmutanten des 5-HT_{3A} Rezeptors einen verminderter Calcium-Einstrom (Quirk et al., 2004).

Auch hTRPC6-E512N, die Glykosylierungsmutante von hTRPC3, und hTRPC6-N561Q sowie hTRPC6-N473Q-N561Q, die Glykosylierungsmutanten von hTRPC6, zeigen eine Verringerung ihrer Expression in der Zellmembran. Wie bei den Glykosylierungsmutanten von 5-HT_{3A} Rezeptor weisen hTRPC6 hTRPC6-N561Q sowie hTRPC6-N473Q-N561Q eine verminderte Aktivierbarkeit auf, was sich in einem verringertem Calcium-Einstroms zeigt (Dietrich et al., 2003). Im Gegensatz dazu weist hTRPC6-E512N eine verringerte konstitutive Aktivität auf bei gleichzeitiger Aktivierbarkeit zu maximalen Stromantworten unter Agonistenapplikation.

Glykosylierung bestimmt nicht nur die Oberflächenexpression verschiedener Rezeptoren, sondern auch deren Ionen-Permeabilität. Wie schon für den 5-HT_{3A} Rezeptor gezeigt, so beeinflusst die Veränderung des Glykosylierungsmusters maßgeblich die Ionen-Permeabilität vom *nikotinergeren Acetylcholin Rezeptor (nACh-R)*. Auch hier liegt eine N-Glykosylierung vor, die eine korrekte Zusammensetzung der einzelnen Rezeptor-Untereinheiten von nACh-R sowie deren korrekten Einbau in die Zellmembran reguliert (Gehle et al., 1991; Gehle et al., 1997; Merlie et al., 1982; Sumikawa et al., 1989). Die Glykosylierungsmutanten von nACh-R zeigen eine verminderte Tendenz zur Desensitivierung nach erfolgter Aktivierung. Ihre Ionen-Permeabilität ist vergrößert (Nishizaki, 2003),

4.4 Die Aktivierung von hTRPC3 und hTRPC6

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigten, dass sowohl die durch hTRPC6-Kanal-Proteine als auch durch hTRPC3-Kanal-Proteine gebildeten Kationen-Kanäle rezeptorgesteuert aktiviert werden konnten. Die Einzelkanalableitungen hatten die Aktivierbarkeit der hTRPC6-Kationen-Kanäle durch SAG, einem DAG-Analogen, bestätigt. Schon Hofmann et al. (1999) hatte die Aktivierbarkeit der TRPC3,6,7-Subfamilie durch DAG nachgewiesen. Allerdings war die Situation bei hTRPC3 weitaus komplexer. In heterologen Zellsystemen unter Verwendung von HEK293 Zellen sowie *CHO Zellen* (chinesischen Hamster-Ovarial-Zellen, „*chinese hamster ovarial*“) ließ sich eine hohe konstitutive Aktivität der durch hTRPC3-Kanal-Proteinen gebildeten Kationen-Kanäle nachweisen (Zitt et al., 1997; Zhu et al., 1998; Hurst et al., 1998). Zhu et al. (1996) beschrieben hTRPC3 als einen rezeptorgesteuerten Kationen-Kanal, der allerdings auch durch *Thapsigargin* aktiviert werden konnte. Thapsigargin ist ein Inhibitor von SERCA. Werden die SERCA inhibiert, kommt es zu einer

Verringerung der Calcium-Ionenkonzentration im SR, was wiederum die hTRPC3-Kationen-Kanäle aktiviert. Dies war eine speichergesteuerte Aktivierung. Allerdings ist ihr Mechanismus bislang unklar. Vasquez et al. (2001 und 2003) konnten in B-Lymphozyten des Huhns nachweisen, dass die Aktivierung der hTRPC3-Kationen-Kanäle von ihrer Oberflächenexpression definiert wird. So werden die hTRPC3-Kationen-Kanäle bei niedriger Oberflächenexpression speichergesteuert, bei hoher Expression in der Zellmembran rezeptorgesteuert aktiviert. Kiselyov et al. (1998) sowie Boulay et al. (1999) berichteten über eine funktionelle Interaktion zwischen den durch hTRPC3 gebildeten Kationen-Kanälen und dem IP₃-Rezeptor (IP₃-R) durch Nachweis spezieller Kontaktareale. hTRPC3-Kationen-Kanäle könnten dieser Hypothese entsprechend direkt durch aktivierte IP₃-R aktiviert werden. Tang et al. (2003) hatten ein neues C-terminal gelegenes Bindungsareal entdeckt, die „*calmodulin- IP₃-receptor-binding-domain (CIRB domain)*“. Durch Bindung des Ca²⁺/Calmodulin-Komplexes an die CIRB Domäne sollte die Aktivität der hTRPC3-Kationen-Kanäle verringert werden. Zhang et al. unterstrichen diese Hypothese durch Zugabe von *Camidazolium*, eines Calmodulin-Inhibitors. Nach Zugabe von Camidazolium war eine Vergrößerung der Aktivität der hTRPC3-Kationen-Kanäle festzustellen. Trebak et al. (2003) zeigten in ihren Arbeiten, dass hTRPC3 wie hTRPC6 rezeptorgesteuert war und durch DAG aktiviert werden konnte, unabhängig von IP₃. Eine erste Funktionsbeschreibung des Aktivierungsmechanismus von hTRPC6-Kationen-Kanäle konnte durch den Einsatz des Kationen-Kanalblockers *Flufenamat* erzielt werden. Flufenamat blockiert gezielt hTRPC3 und hTRPC7. Ein Anstieg des Stroms von hTRPC6 war die Folge (Inoue et al., 2001; Jung et al., 2002). Zudem schienen die von hTRPC6-Kanal-Proteinen gebildeten Kationen-Kanäle ebenfalls vom Ca²⁺/Calmodulin-Komplex beeinflusst zu werden. Nach Zugabe von Camidazolium zeigten die hTRPC6-Kationen-Kanäle allerdings eine Verringerung ihrer Aktivität (Boulay et al., 2002). Ca²⁺/Calmodulin-Komplexe führten demzufolge zu einer Aktivierung der hTRPC6-Kationen-Kanäle.

Die genauen Aktivierungsmechanismen bleiben bislang unklar. Dies gab erneut Anlass zur Frage, ob hTRPC3 und hTRPC6 funktionell austauschbar, also redundant sind. Zudem bilden hTRPC3 und hTRPC6 zusammen Heterotetramere. Ferner können alle Mitglieder der hTRPC3,6,7-Subfamilie durch DAG aktiviert werden (Hofmann et al., 2002). Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten war es um so wichtiger, möglich Unterschiede zwischen den Mitgliedern der hTRPC3,6,7-Subfamilie festzustellen.

Erst die Arbeitsgruppe von Dietrich et al. (2003) konnten signifikante Unterschiede zwischen hTRPC3 und hTRPC6 zeigen. hTRPC3 zeigte sowohl in Mangan-Quench-Experimenten als auch in elektrophysiologischen Untersuchungen eine signifikant größere konstitutive Aktivität als hTRPC6. hTRPC6 unterstand hinsichtlich seiner Aktivität einer feineren Regulation. Zudem konnten Dietrich et al. (2003) erstmals zeigen, dass das extrazelluläre Glykosylierungsmuster die unterschiedlichen biophysikalischen Eigenschaften definierte.

4.5 Physiologische Rolle von hTRPC3 und hTRPC6

Auch wenn nachgewiesen wurde, dass zwei extrazelluläre Glycosylierungsstrukturen eine verringerte Basalaktivität von hTRPC6 bedingen, so bleibt der eigentliche Mechanismus unklar. hTRPC6 hat sich als ein rezeptorgesteuerter, in seiner Aktivität fein reguliertes Kanal-Protein gezeigt. Rezeptorgesteuerte Kationen-Kanäle, wie von hTRPC6 gebildet, kommen in vielerlei Geweben vor. Das Vorkommen von hTRPC6-Kanälen wurde in Blutplättchen (Haddock et al., 2002) und für glatte Muskelzellen der Aorta (Jung et al., 2002) beschrieben. Es wird angenommen, dass TRPC6 auch an der Regulation der α_1 -Adrenozeptor-gesteuerten Kationen-Kanäle beteiligt ist (Inoue et al., 2001). Zudem soll hTRPC6 verantwortlich für den *Bayliss-Effekt* sein (Welsh et al., 2002). Der Bayliss-Effekt beschreibt die Fähigkeit der Arteriolen und kleinen Arterien zur Autoregulation des intravasalen Druckes und damit den Blutdruckes. Auch wenn demonstriert worden ist, dass hTRPC3 und hTRPC6 unterschiedliche biophysikalische Eigenschaften aufweisen, so kann aktuell noch nicht hinreichend geklärt werden, welche unterschiedlichen zellulären Aufgaben sie wahrnehmen. hTRPC3 kommt vor allem in cerebellären Purkinje-Fasern sowie in Zellen des Nervus olfactorius vor (Otsuka et al., 1998). hTRPC3-Kationen-Kanäle scheinen dort an der Signalkaskade beteiligt zu sein, die durch den „*brain-derived neurotrophic factor (BDNF)*“ vermittelt wird (Li et al., 1999). Zudem wird vermutet, dass hTRPC3-Kationen-Kanäle an der Bewältigung oxidativen Stresses beteiligt sind (Groschner et al., 2004).

Es bleibt aktuell nur Spekulation, ob eine Veränderung des Glykosylierungsmusters von hTRPC3 und hTRPC6 sich in Erkrankungen manifestieren kann oder für den betroffenen Organismus keine Konsequenzen hat. Für andere Mitglieder der TRP-Superfamilie ist eine Beteiligung an Erkrankungen bereits nachgewiesen worden. So sind Mutationen von TRPP2 aller Wahrscheinlichkeit für die

polyzystische Nierendegeneration vom autosomal-dominanten Typ (Potter III nach der Einteilung von Potter und Osathanondh) verantwortlich (Wu et al., 1998; Boulter et al., 2001).

4.6 Glykosylierung und Krankheit

Eine Veränderung der Glycosylierungsstrukturen führt zu mannigfaltigen Variationen von Protein-Eigenschaften wie beispielsweise Assemblierung, Oberflächenexpression und Aktivierbarkeit bzw. Affinität zum Liganden. Glykosylierte Proteine spielen eine wichtige Rolle im Metabolismus, in der Zellmigration und in der körpereigenen Abwehr (Varki, 1993). Ein Verlust bzw. eine Änderung dieser Glykosylierungsmuster kann schwerwiegenden Konsequenzen haben. Dies wurde schon bei den Ausführungen über die β_1 -Integrinen kurz erwähnt. Eine Änderung der Glykosylierung kann durch Mutation erworben oder, genetisch fixiert, vererbt werden. Im letzteren Fall spricht man *vererbten Glykosylierungsdefekten* („*congenital disorders of glycosylation*“, *CDG*), früher als *Carbohydrat defiziente Glykoprotein-Syndrome* bezeichnet. Diese Erkrankungen umfassen verschiedene Enzymdefekte, die allesamt auf unterschiedlichen Ebenen die Glykosylierung beeinflussen. Abbildung 56 zeigt eine Zusammenstellung der einzelnen vererbten Glykosylierungsdefekte.

Ursache und Symptome der CDG.

CDG	Gen	Enzyme	Typische Symptome
CDG-Ia	PMM2	Phosphomannomutase II	Mentale Retardierung (MR), Hypotonie, Esotropie, Lipodystrophie, cerebelläre Hypoplasie, Epilepsie
CDG-Ib	MPI	Phosphomannose-Isomerase	Leberfibrose, Malabsorption, Koagulopathie, Hypoglykämie
CDG-Ic	ALG6	Dol-P-Glc: Man ₉ GlcNAc ₂ -PP-Dol-Glucosyltransferase	MR, Hypotonie, Epilepsie
CDG-Id	ALG3	Dol-P-Man: Man ₅ GlcNAc ₂ -PP-Dol-Mannosyltransferase	Schwere MR, Atrophie des Sehnervens
CDG-Ie	DPM1	Dol-P-Man-Synthase I	Schwere MR, Epilepsie, Hypotonie,
CDG-If	MPDU1	GDP-Man: Dol-P-Mannosyltransferase Mannose-P-Dolichol Utilisationsdefekt 1/ Lec35	Synostose des Radio-ulnar-Gelenks (mildly dysmorphic), Koagulopathie Kleinwuchs, Ichthyosis, MR, Retinopathie
CDG-Ig	ALG12	Dol-P-Man: Man ₇ GlcNAc ₂ -PP-Dol-Mannosyltransferase	Hypotonie, MR, Gesichtsdysmorphismus, Microcephalie, Infektanfälligkeit
CDG-Ih	ALG8	Dol-P-Glc: Glc ₁ Man ₉ GlcNAc ₂ -PP-Dol-Glucosyltransferase	Hepatomegalie, Koagulopathie, Malabsorption, Niereninsuffizienz
CDG-Ii	ALG2	GDP-Man: Man ₁ GlcNAc ₂ -PP-Dol-	Normal zur Geburt, Hepatomegalie,

4. Diskussion

CDG-Ij	DPAGT1	Mannosyltransferase	Koagulopathie, MR, Hypomyelination, Epilepsie
		UDP-GlcNAc: Dolichol-phosphat N-Acetylglucosamine-1-phosphate-Transferase	Schwere MR, Hypotonie, Epilepsie, Microcephalie
CDG-Ik	ALG1	GDP-Man: GlcNAc ₂ -PP-Dol-Mannosyltransferase	Schwere MR, Hypotonie, Microcephalie Epilepsie, Fieber, Koagulopathie, Nephrotisches Syndrom
CDG-IL	ALG9	Dol-P-Man: Man ₆ and 8 GlcNAc ₂ -PP-Dol- Mannosyltransferase	Schwere Microcephalie, Hepatomegalie, Hypotonie, Epilepsie
CDG-IIa	MGAT2	GlcNAcT-II	MR, Gesichtsdysmorphismus, Epilepsie
CDG-IIb	GLS1	Glucosidase I	Dysmorphismus, Hypotonie, Epilepsie, Hepatomegalie, Leberfibrose, Tod ab 25 Monaten
CDG-IIc	SLC35C1/FUCT1	GDP-Fucose Transporter	Infektanfälligkeit, Neutrophilie, MR, Microcephalie, Hypotonie
CDG-IId	B4GALT1	β1,4-Galactosyltransferase	Hypotonie und Myopathie, spontane Hämorrhagie
CDG-IIe	COG7	COG Komplex, Untereinheit 7	Fatal in der Säuglingszeit, Dysmorphismus, Hypotonie, Epilepsie, Hepatomegalie
CDG-IIf	SLC35A1	CMP-Sialinsäure-Transporter	progressiver Ikterus, Infektanfälligkeit, Herzfehler
			Thrombozytopenie, abnorme Thrombozytenglykoproteine, kein neurologisches Defizit

Abb. 56 Tabelle der vererbten Glykosylierungsdefekte: Dargestellt sind die Vertreter der vererbten Glykosylierungsdefekte („congenital disorders of glycosylation“, **CDG**) mitsamt ihrem jeweiligen Enzymdefekt und ihren Auswirkungen. Unterschieden werden **CDG Typ I** und **CDG Typ II** mit ihren jeweiligen Unterscheidungen.

Die oben angegebenen vererbten Glykosylierungsdefekte werden in *CDG Typ I* und *CDG Typ II* unterschieden. Unterscheidungsmerkmal ist die Lokalisation des jeweiligen Enzymdefekts, der die N-Glykosylierung an unterschiedlichen Stellen betrifft. Glykosylierungsdefekte, die vor Übertragung der Glykosylierungsstruktur auf das jeweilige Protein zum Tragen kommen, zählen zu den vererbten Glykosylierungsdefekte vom Typ I. Sobald das im ER aufgebaute Glykosylierungsbäumchen auf das Protein übertragen worden ist, handelt es sich bei Enzymdefekten um vererbte Glykosylierungsdefekte vom Typ II. Beide Typen werden noch in verschiedene Subtypen eingeteilt. Gekennzeichnet werden sie in alphabetischer Reihenfolge (z.B.: Typ Ia, Typ IIg). Die vererbten Glykosylierungsdefekte vom Typ I werden in Abbildung 57, die vom Typ II in Abbildung 58 dargestellt.

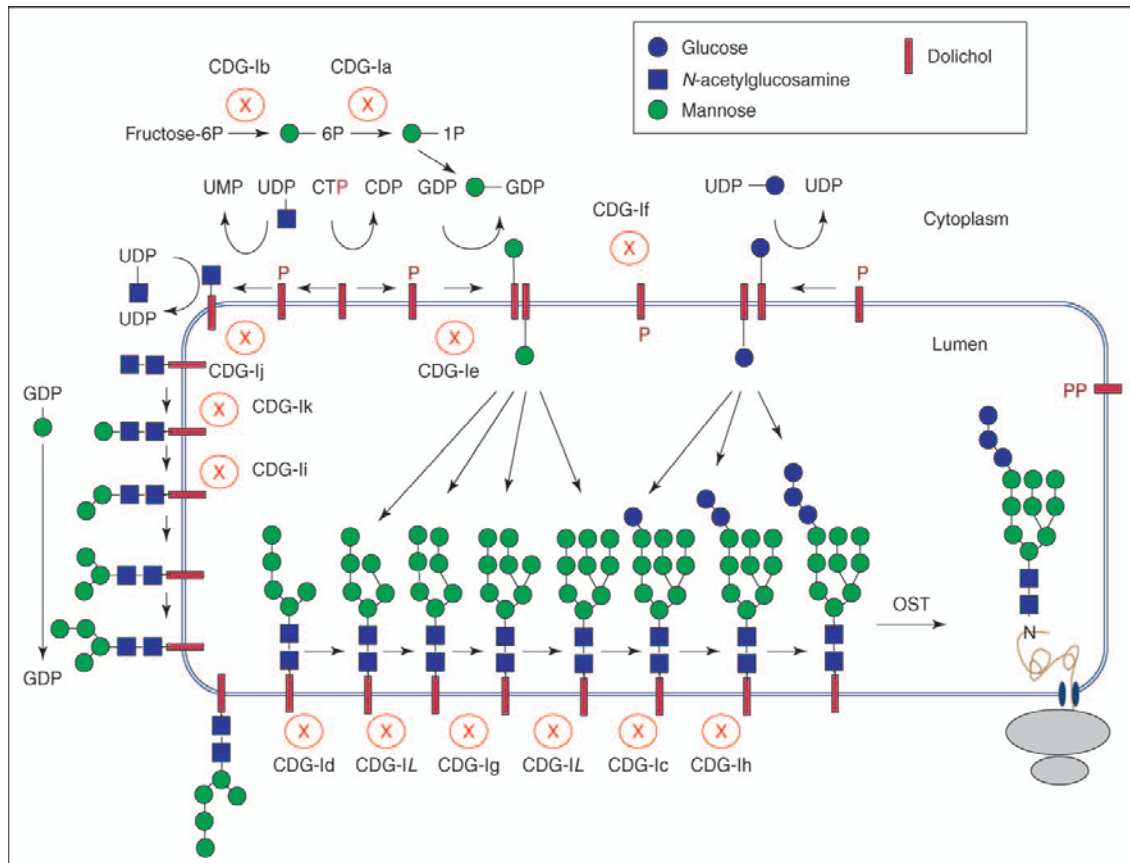


Abb. 57 Vererbte Glykosylierungsdefekte vom Typ I: Dargestellt sind die vererbten Glykosylierungsdefekte vom Typ I („congenital disorders of glycosylation“, **CDG-I**). Die verschiedenen Vertreter der CDG-I basieren auf unterschiedlichen Enzymdefekten (X). Zu erkennen sind CDG-Ia bis CDG-IL. Die **Oligosaccharyltransferase (OST)** überträgt die Glykosylierungsstruktur auf das jeweilige Protein.

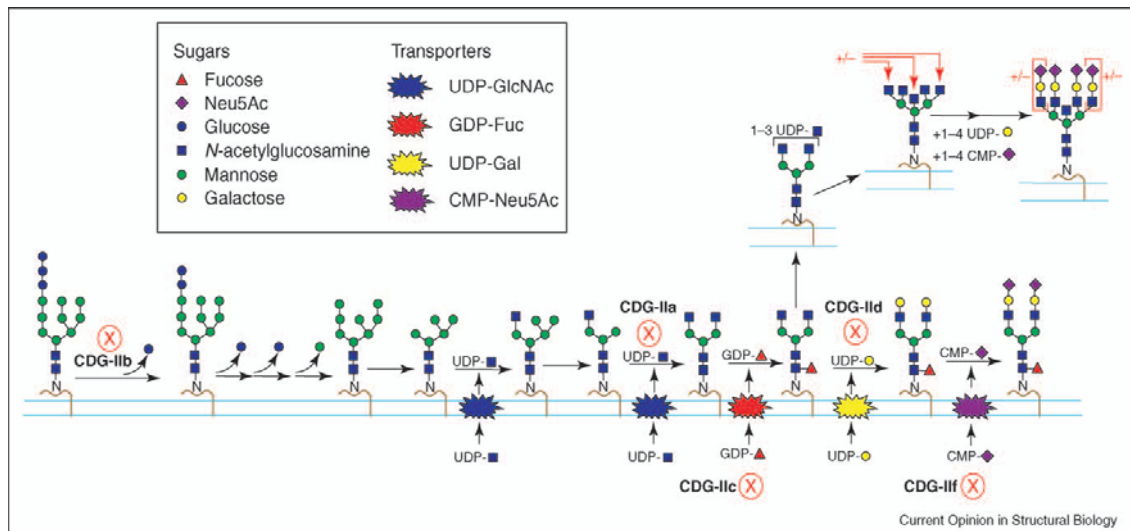


Abb. 58 Vererbte Glykosylierungsdefekte vom Typ II: dargestellt sind die vererbten Glykosylierungsdefekte („congenital disorders of glycosylation“, **CDG-II**). Nach Übertragen der Glukosylierungsstruktur auf das jeweilige Protein spricht man von **CDG-II**. Jeder Vertreter der CDG-II weist einen spezifischen Enzymdefekt (X) auf (Abbildungen aus S. Grünwald et al., 2002, congenital disorders of glycosylation: a review, Pediatric research, 52, 618 – 624).

Wie in den vorherigen Abschnitten erläutert, hat eine Veränderung der Glycosylierungsstruktur von hTRPC3 und hTRPC6 Auswirkung auf deren Oberflächenexpression, Assemblierung sowie konstitutiver Aktivität. Es bleibt allerdings noch Gegenstand der Diskussion, ob und inwiefern sich aus veränderten Glykosylierungsstrukturen von hTRPC3 und hTRPC6 Einschränkungen für den betroffenen Organismus manifestieren. Experimente *in vivo* würden Aufschluss darüber geben, welche Auswirkung eine Veränderung der Glykosylierungsstruktur der hTRPC3,6,7-Subfamilie nach sich ziehen würde. Letztlich würde dies dazu beitragen, mehr über die Funktion dieser TRPC-Subfamilie zu erfahren.

5. Zusammenfassung

An lebenswichtigen Prozessen wie Kognition, Atem- und Kreislaufregulierung sind Kanal-Proteine der *transienten Rezeptorpotential-(TRP)*-Superfamilie beteiligt. Beruhend auf Sequenzhomologien ihrer Aminosäurestruktur und funktionellen Ähnlichkeiten, kann die TRP-Superfamilie in mehrere Familien und Subfamilien unterteilt werden. Eine der ersten entdeckten Familien ist die TRPC („canonical“ oder „classical“-Familie, die wiederum in vier Subfamilien unterteilt werden kann. Vertreter der beim Menschen vorkommenden (human, h) TRPC3,6,7-Subfamilie bilden rezeptor- oder speichergesteuerte, nicht-selektive Calcium leitende Kationen-Kanäle. hTRPC3, hTRPC6 und hTRPC7 können allesamt durch Diacylglycerol aktiviert werden. Jeweils vier Kanal-Proteine bilden mit sich selbst (Homotetramere) oder untereinander (Heterotetramere), aber nicht mit Vertretern anderer TRPC-Subfamilien funktionelle Kationen-Kanäle. Diese Ähnlichkeiten warfen die Frage auf, ob sich hTRPC3 und hTRPC6 in ihren biophysikalischen Eigenschaften gleichen und damit funktionell austauschbar, also redundant sind oder ob sie unterschiedliche zelluläre Funktionen besitzen. Zudem sollte geklärt werden, ob das extrazelluläre Glykosylierungsmuster vom hTRPC3 (eine Glykosylierungsstruktur auf der ersten extrazellulären Schleife) und hTRPC6 (jeweils eine Glykosylierungsstruktur auf den ersten beiden extrazellulären Schleifen, *e1* und *e2*) biophysikalische Eigenschaften definiert. Mittels der Patch-Clamp-Technik in der Ganzzell- und Einzelkanalkonfiguration sowie mittels Erschaffung von Glykosylierungsmutanten der Wildtyp-Kanalproteine hTRPC3 und hTRPC6 konnten folgende Aussagen über die biophysikalischen Eigenschaften getroffen werden:

1. hTRPC3 bildet funktionelle Kanäle mit hoher konstitutiver Aktivität (Basalaktivität) und unterscheidet sich darin signifikant von hTRPC6
2. hTRPC6-N561Q (Elimination der Glykosylierungsstruktur auf *e2*) und hTRPC6-N473Q-N561Q (Elimination der Glykosylierungsstruktur auf *e1* und *e2*) bilden wie hTRPC3 ebenfalls funktionelle Kationen-Kanäle mit hoher Basalaktivität und unterscheiden sich darin ebenfalls signifikant von hTRPC6
3. hTRPC3-E512N (Hinzufügen einer zweiten Glykosylierungsstruktur) bildet im Vergleich zu hTRPC3 funktionelle Kationen-Kanäle mit deutlich verringerter Basalaktivität

4. das Glycosylierungsmuster beeinflusst jedoch nicht die Aktivierung durch Agonisten (Histamin bzw. Carbachol in maximaler Wirkkonzentration)

Das Glykosylierungsmuster entscheidet demnach über die konstitutive Aktivität funktioneller Kationen-Kanäle. hTRPC3 ist demnach konstitutiv hochaktiv. Die Aktivität von hTRPC6 ist dagegen fein reguliert. Beide zeigen unterschiedliche biophysikalische Eigenschaften. Sie müssen demnach unterschiedliche zelluläre Funktionen ausüben.

5. Summary

In all processes of living as breathing and regulation of circuit members of the transient receptor potential (TRP-) channels take part. The whole TRP-superfamily can be divided into several families and subfamilies. The TRPC (canonical or classical)-family was described first and consists of seven members, which can be divided into four subfamilies. The TRPC3,6,7-subfamily of human beings called h (human) TRPC3,6,7 are receptor- or store-operated non-selective cation channels. They can be activated by diacylglycerol. Four of hTRPC3,6,7-proteins can build an homotetrameric or heterotetrameric cation channel. Because of these structural and functional similarities it was not clear, whether hTRPC3,6,7 have equal biophysical characteristics and can be changed vice versa. Additionally it was not cleared, whether the extracellular glycosylation patterns determine biophysical characteristics. For these examinations mutants of hTRPC3,6,7-proteins were created. By using patch clamp in whole-cell and single-channel configuration following statements could be made:

1. hTRPC3 has only one glycosylation pattern on the first extracellular loop (*e1*), on the contrary hTRPC6 has another one on the second extracellular loop (*e2*)
2. hTRPC3 builds functional cation channels with high basal activity and hereby significant difference to hTRPC6 exists
3. hTRPC6-N561Q (elimination of glycosylation on *e2*) and hTRPC6-N473Q-N561Q (elimination of glycosylation on *e1* and *e2*) build functional cation channels with high basal activity as hTRPC3 does and as well significant differences to hTRPC6 exist
4. hTRPC3-E512N (applying glycosylation pattern on *e2*) builds functional cation channels with low basal activity and hereby differs to hTRPC3 significantly
5. glycosylation does not influence activation by applying histamine or carbachol

So glycosylation determines the basal activity of hTRPC3 and hTRPC6. hTRPC3 shows significantly higher basal activity as hTRPC6 has. Their biophysical characteristics differ. So our conclusion is, hTRPC3 and hTRPC6 would have different cellular function.

6. Literaturverzeichnis

- Alper, J. Glycobiology. (2003) Turning sweet on cancer. *Science*. 301, 159-60.
- Akiyama, S.K., Yamada, K.M. (1987) Biosynthesis and acquisition of biological activity of the fibronectin receptor. *J. Biol. Chem.* 262, 17536-42.
- Aridor, M., Balch, W.E. (1999) Integration of endoplasmic reticulum signaling in health and disease. *Nat. Med.* 5, 745-51.
- Aridor, M., Fish, K.N., Bannykh, S., Weissman, J., Roberts, T.H., Lippincott-Schwartz, J., Balch, W.E. (2001) The Sar1 GTPase coordinates biosynthetic cargo selection with endoplasmic reticulum export site assembly. *J. Cell Biol.* 152, 213-29.
- Barnes, N.M., Sharp, T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 38, 1083-152.
- Bednarek, S.Y., Ravazzola, M., Hosobuchi, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Schekman, R., Orci, L. (1995) COPI- and COPII-coated vesicles bud directly from the endoplasmic reticulum in yeast. *Cell*. 83, 1183-96.
- Bellis, S.L. (2004) Variant glycosylation: an underappreciated regulatory mechanism for beta1 integrins. *Biochim. Biophys. Acta*. 1663, 52-60.
- Benham, A.M., Braakman, I. (2000) Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35, 433-73.
- Bezprozvanny, I., Watras, J., Ehrlich, B.E. (1991) Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*. 351, 751-4.
- Bloomquist, B.T., Shortridge, R.D., Schneuwly, S., Perdew, M., Montell, C., Steller, H., Rubin, G., Pak, W.L. (1988) Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila*, norpA, and its role in phototransduction. *Cell*. 54, 723-33.

Bonifacino, J.S., Weissman, A.M. (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annual Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 19-57.

Boulay, G., Brown, D.M., Qin, N., Jiang, M., Dietrich, A., Zhu, M.X., Chen, Z., Birnbaumer, M., Mikoshiba, K., Birnbaumer, L. (1999) Modulation of Ca(2+) entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca(2+) entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96, 14955-60.

Boulay, G., Zhu, X., Pexton, M., Jiang, M., Hurst, M., Stefani, E., Birnbaumer, L. (1997) Cloning and expression of a novel mammalian homolog of *Drosophila* transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *Biol. Chem.* 272, 29672-80.

Boulter, C., Mulroy, S., Webb, S., Fleming, S., Brindle, K., Sandford, R. (2001) Cardiovascular, skeletal, and renal defects in mice with a targeted disruption of the *Pkd1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98, 2174-9.

Brodsky, J.L., McCracken, A.A. (1999) ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10, 507-13.

Buchner, J. (1996) Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.* 10, 10-19.

Burda, P., Aepli, M. (1999) The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1426, 239-57.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 389, 816-24.

Clapham, D.E., Runnels, L.W., Strubing, C. (2001) The TRP ion channel family. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 387-96.

Chevet, E., Cameron, P.H., Pelletier, M.F., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J. (2001) The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 120-4.

Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A.I., Chao, M.V., Julius, D. (2001) Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature.* 411, 957-62.

Coetzee, W.A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M.S., Ozaita, A., Poutney, D., Saganich, M., Vega-Saenz de Miera, E., Rudy, B. (1999) Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann. N Y Acad. Sci.* 868, 233-85.

Cole, N.B., Smith, C.L., Sciaky, N., Terasaki, M., Edidin, M., Lippincott-Schwartz, J. (1996) Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science.* 273, 797-801.

Collier, E., Gordon, P. (1991) O-linked oligosaccharides on insulin receptor. *Diabetes.* 40, 197-203.

Cosens, D.J., Manning, A. (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature.* 224, 285-7.

Dall'Olio, F., Chiricolo, M. (2001) Sialyltransferases in cancer. *Glycoconj. J.* 18, 841-50.

Damsky, C.H., Ilic, D. (2002) Integrin signaling: it's where the action is. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 594-602. Review.

De Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., Unger, T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* 52, 415-72.

Dennis, J.W., Granovsky, M., Warren, C.E. (1999) Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta.* 1473, 21-34.

Deslauriers, B., Ponce, C., Lombard., C., Languier, R., Bonnafous, J.C., Marie, J. (1999) N-glycosylation requirements for the AT1a angiotensin II receptor delivery to the plasma membrane. *Biochem. J.* 339, 397-405.

Di Palma, F., Belyantseva, I.A., Kim, H.J., Vogt, T.F., Kachar, B., Noben-Trauth, K. (2002) Mutations in Mcoln3 associated with deafness and pigmentation defects in varitint-waddler (Va) mice. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 14994-9.

Dietrich, A., Mederos y Schnitzler, Emmel, J., Kalwa, H., Hofmann, T., Gudermann, T. (2003) N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J. Biol. Chem.* 278, 47842-52.

Duncan, L.M., Deeds, J., Hunter, J., Shao, J., Holmgren, L.M., Woolf, E.A., Tepper, R.I., Shyjan, A.W. (1998) Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res.* 58, 1515-20.

Edge, A.S.B., Spiro, R.G. (1997) Structure of the O-linked oligosaccharides from a major thyroid cell surface glycoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* 343, 73-80.

Ellgaard, L., Molinari, M., Helenius, A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science.* 286, 1882-8.

Fanger, M.W., Smyth, D.G. (1972) The oligosaccharide units of rabbit immunoglobulin G. Multiple carbohydrate attachment sites. *Biochem. J.* 127, 757-65.

Farquhar, M., Hauri, H.-P. (1997) *The Golgi Apparatus*; Berger, E, Roth, J., Eds.; Birkhäuser Verlag: Basel, pp 37 – 61

Freichel, M., Suh, S.H., Pfeifer, A., Schweig, U., Trost, C., Weissgerber, P., Biel, M., Philipp, S., Freise, D., Droogmans, G., Hofmann, F., Flockerzi, V., Nilius, B. (2001) Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nat. Cell Biol.* 3, 121-7.

Gehle, V.M., Sumikawa, K. (1991) Site-directed mutagenesis of the conserved N-glycosylation site on the nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *11*, 17-25.

Gehle, V.M., Walcott, E.C., Nishizaki, T., Sumikawa, K. (1997) N-glycosylation at the conserved sites ensures the expression of properly folded functional ACh receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *45*, 219-29.

Gething, M.J., Sambrook, J. (1990) Transport and assembly processes in the endoplasmic reticulum. *Semin. Cell Biol.* *1*, 65-72.

Gewinner, C. (2001) Identifikation und Charakterisierung der dynamischen O-GlcNAc Modifikation von Stat5a, Inauguraldisseration, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Giancotti, F.G., Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. *Science.* *285*, 1028-32. Review.

Gorelik, E., Galili, U., Raz, A. (2001) On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* *20*, 245-77.

Goel, M., Sinkins, W.D., Schilling, W.P. (2002) Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* *277*, 48303-10.

Greka, A., Navarro, B., Oancea, E., Duggan, A., Clapham, D.E. (2003) TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nat. Neurosci.* *6*, 837-45.

Grünewald, S., Matthijs, G., Jaeken, J. (2002) Congenital disorders of glycosylation: a review. *Pediatr. Res.* *52*, 618-24.

Guha-Niyogi, A., Sullivan, D.R., Turco, S.J. (2001) Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology.* *11*, 45-59.

Hakomori, S. (2002) Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 10231-3.

Hammond, C., Braakman, I., Helenius, A. (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91, 913-7.

Hardie, R.C., Minke, B. (1992) The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron.* 8, 643-51.

Hardie, R.C., Raghu, P. (2001) Visual transduction in *Drosophila*. *Nature.* 413, 186-93.

Hassock, S.R., Zhu, M.X., Trost, C., Flockerzi, V., Authi, K.S. (2002) Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel. *Blood.* 100, 2801-11.

Haynes, P.A. (1998) Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation. *Glycobiology.* 8, 1-5

Heino, J., Ignatz, R.A., Hemler, M.E., Crouse, C., Massague, J. (1989) Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. *J. Biol. Chem.* 264, 380-8.

Herscovics, A., Orlean, P. (1993) Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J.* 7, 540-50.

Hirschberg, C.B., Snider, M.D. (1987) Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 63-87.

Herscovics, A. (1999) Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1473, 96-107.

Herscovics, A. (1999) Processing glycosidases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1426, 275-85.

Hille, B. (2001) Ionic Channels of Excitable Membrans, 3rd Ed., Sinauer, Sunderland, MA

Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., Gudermann, T. (2000) Cloning, expression and subcellular localization of two novel splice variants of mouse transient receptor potential channel 2. *Biochem. J.* 351, 115-22.

Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., Gudermann, T. (2002) Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 7461-6.

Hofmann, T., Obukhov, A.G., Schäfer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., Schultz, G. (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature.* 397, 259-63.

Hoth, M., Penner, R. (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature.* 355, 353-6.

Hu, Y., Vaca, L., Zhu, X., Birnbaumer, L., Kunze, D.L., Schilling, W.P. (1994) Appearance of a novel Ca²⁺ influx pathway in Sf9 insect cells following expression of the transient receptor potential-like (trpl) protein of *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 1050-6.

Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J., Sandhoff, K. (2000) Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* 1485, 63-99.

Hynes, R.O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110, 673-87.

Igarashi, Y. (1997) Functional roles of sphingosine, sphingosine 1-phosphate, and methylsphingosines: in regard to membrane sphingolipid signaling pathways. *J. Biochem.* 122, 1080-7.

Igarashi, Y., Yatomi, Y. (1998) Sphingosine 1-phosphate is a blood constituent released from activated platelets, possibly playing a variety of physiological and pathophysiological roles. *Acta Biochim. Pol.* **45**, 299-309.

Inoue, R., Okada, T., Onoue, H., Hara, Y., Shimizu, S., Naitoh, S., Ito, Y., Mori, Y. (2001) The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular $\alpha(1)$ -adrenoceptor-activated $\text{Ca}(2+)$ -permeable cation channel. *Circ. Res.* **88**, 325-32.

Jan, L.Y., Jan, Y.N. (1997) Ways and means for left shifts in the MaxiK channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**, 13383-5.

Jaspers, M., de Strooper, B., Spaepen, M., van Leuven, F., David, G., van den Berghe, H., Cassiman, J.J. (1988) Post-translational modification of the beta-subunit of the human fibronectin receptor. *FEBS Lett.* **231**, 402-6.

Jayadev, S., Smith, R.D., Jagadeesh, G., Baukal, A.J., Hunyadi, L., Catt, K.J. (1999) N-linked glycosylation is required for optimal AT1a angiotensin receptor expression in COS-7 cells. *Endocrinology.* **140**, 2010-7.

Johansen, P.G., Marshall, R.G., Neuberger, A. (1961) Carbohydrates in protein. 3 The preparation and some of the properties of a glycopeptide from hen's-egg albumin. *Biochem. J.* **78**, 518-27.

Johnson, A.E., van Waes, M.A. (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 799-842.

Jordt, S.E., Julius, D. (2002) Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell.* **108** 421-30.

Jung, S., Strotmann, R., Schultz, G., Plant, T.D. (2002) TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**, 347-59.

Kelliher K.R., Spehr M., Li X.H., Zufall F., Leinders-Zufall T. (2006) Pheromonal recognition memory induced by TRPC2-independent vomeronasal sensing, *Eur. J. Neurosci.* 23, 3385-90.

Kidd, F.J., Levy, J.C., Nielsen, M., Hamon, M., Gozlan., H. (1993) Characterisation of the non-5-HT₃ high-affinity 'R' binding site for (R)-zacopride in brain and other tissues. *European Journal of pharmacology.* 247, 45-56.

Kim, L.T., Ishihara, S., Lee, C.C., Akiyama, S.K., Yamada, K.M., Grinnell, F. Altered glycosylation and cell surface expression of beta 1 integrin receptors during keratinocyte activation. *J. Cell Sci.* 103, 743-53.

Kim, P.S., Arvan, P. (1998) Endocrinopathies in the family of endoplasmic reticulum (ER) storage diseases: disorders of protein trafficking and the role of ER molecular chaperones. *Endocr. Rev.* 19, 173-202.

Kiselyov, K., Xu, X., Mozhayeva, G., Kuo, T., Pessah, I., Mignery, G., Zhu, X., Birnbaumer, L., Muallem, S. (1998) Functional interaction between InsP₃ receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature.* 396, 478-82.

Kluk, M., Hla, T. (2002) Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1582, 72-80.

Kohno, T., Igarashi, Y. (2004) Roles for N-glycosylation in the dynamics of Edg-1/S1P1 in sphingosine 1-phosphate-stimulated cells. *Glycoconj. J.* 21, 497-501.

Kopito, R.R. (1997) ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell.* 88, 427-30.

Kuznetsov, G., Bush, K.T., Zhang, P.L., Nigam, S.K. (1996) Perturbations in maturation of secretory proteins and their association with endoplasmic reticulum chaperones in a cell culture model for epithelial ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93, 8584-9.

Lanctot, P.M., Leclerc, P.C., Escher, E., Leduc, R., Guillemette, G. (1999) Role of N-glycosylation in the expression and functional properties of human AT1 receptor. *Biochemistry*. 38, 8621-7.

Lanctot, P.M., Leclerc, P.C., Clement, M., Auger-Messier, M., Escher, E., Leduc, R., Guillemette, G. (2005) Importance of N-glycosylation positioning for cell-surface expression, targeting, affinity and quality control of the human AT1 receptor. *Biochem. J.* 390, 367-76.

Lechner, J., Wieland, F. (1989) Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 173-94.

Lenter, M., Vestweber, D. (1994) The integrin chains beta 1 and alpha 6 associate with the chaperone calnexin prior to integrin assembly. *J. Biol. Chem.* 269, 12263-8.

Lewis, R.S. (2007) The molecular choreography of a store-operated calcium channel. *Nature*, 446, 284-7.

Liman, E.R., Corey, D.P., Dulac, C. (1999) TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96, 5791-6.

Lintschinger, B., Balzer-Geldsetzer, M., Baskaran, T., Graier, W.F., Romanin, C., Zhu, M.X., Groschner, K. (2000) Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca²⁺-sensitive cation channels. *J. Biol. Chem.* 275, 27799-805.

Lippincott-Schwartz, J. (2001) The secretory membrane system studied in real-time. Robert Feulgen Prize Lecture, *Histochem. Cell Biol.* 116, 97-107.

Lippincott-Schwartz, J., Roberts, T.H., Hirschberg, K. (2000) Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 557-89.

Lo, M.V., Pak, W.L. (1981) Light-induced pigment granule migration in the retinal cells of *Drosophila melanogaster*. Comparison of wild type with ERG-defective mutants. *J. Gen. Physiol.* 77, 155-75.

Luik R.M., Wu M.M., Buchanan J., Lewis R.S. (2006) The elementary unit of store-operated Ca^{2+} entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *J. Cell Biol.* 174, 815-25.

Lohmander, L.S., DeLuca, S., Nilsson, B., Hascall, V.C., Caputo, C.B., Kimura, J.H., Heinegard, D. (1980) Oligosaccharides on proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. *J. Biol. Chem.* 255, 6084-91.

Merlie, J.P., Sebbane, R., Tzartos, S., Lindstrom, J. (1982) Inhibition of glycosylation with tunicamycin blocks assembly of newly synthesized acetylcholine receptor subunits in muscle cells. *J. Biol. Chem.* 257, 2694-701.

Messner, P. (1997) Bacterial glycoproteins. *Glycoconj. J.* 14, 3-11.

Miranti, C.K., Brugge, J.S. (2002) Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat. Cell Biol.* 4, 83-90.

Montell, C. (1999) Visual transduction in *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 231-68.

Montell, C. (2001) Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE.* 90, RE1.

Montell, C., Jones, K., Hafen, E., Rubin, G. (1985) Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation. *Science.* 230, 1040-3.

Montell, C., Rubin, G.M. (1989) Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron.* 2, 1313-23.

Montreuil, J. (1980) Primary structure of glycoprotein glycans: basis for the molecular biology of glycoproteins. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 37, 157-223.

Morales, M., Battenberg, E. (1998) Distribution of neurons expressing immunoreactivity for the 5HT₃ receptor subtype in the rat brain and spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 402, 385-401.

Nehls, S., Snapp, E.L., Cole, N.B., Zaal, K.J., Kenworthy, A.K., Roberts, T.H., Ellenberg, J., Presley, J.F., Siggia, E., Lippincott-Schwartz, J. (2000) Dynamics and retention of misfolded proteins in native ER membranes. *Nat. Cell Biol.* 2, 288-95.

Nishizaki, T. (2003) N-glycosylation sites on the nicotinic ACh receptor subunits regulate receptor channel desensitization and conductance. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 114, 172-6.

Okada, T., Inoue, R., Yamazaki, K., Maeda, A., Kurosaki, T., Yamakuni, T., Tanaka, I., Shimizu, S., Ikenaka, K., Imoto, K., Mori, Y. (1999) Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca²⁺-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 27359-70.

Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, S., Spiegel, S. (1998) Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 12576-83.

Otsuguro K.I., Tang J., Tang Y., Xiao R., Freichel M., Tsvilovskyy V., Ito S., Flockerzi V., Zhu M.X., Zholos A.V. (2008) Isoform-specific inhibition of TRPC4 channel by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.*

Parthasarathy, N., Spiro, R.G. (1984) Isolation and characterization of the heparan sulfate proteoglycan of the bovine glomerular basement membrane. *J. Biol. Chem.* 259, 12749-55.

Patterson, R.L., van Rossum, D.B., Gill, D.L. (1999) Store-operated Ca²⁺ entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell.* 98, 487-99.

Pelham, H.R.B. (1996) The dynamic organisation of the secretory pathway. *Cell Struct. Funct.* 21, 413-9.

Perez-Vilar, J., Eckhardt, A.E., Hill, R.L. (1996) Porcine submaxillary mucin forms disulfide-bonded dimers between its carboxyl-terminal domains. *J. Biol. Chem.* 271, 9845-50.

Phillips, A.M., Bull, A., Kelly, L.E. (1992) Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene. *Neuron.* 8, 631-42.

Quirk, P.L., Rao, S., Roth, B.L., Siegel, R.E. (2004) Three putative N-glycosylation sites within the murine 5-HT_{3A} receptor sequence affect plasma membrane targeting, ligand binding, and calcium influx in heterologous mammalian cells. *J. Neurosci. Res.* 77, 498-506.

Philipp, S., Hambrecht, J., Braslavski, L., Schroth, G., Freichel, M., Murakami, M., Cavalie, A., Flockerzi, V. (1998) A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J.* 17, 4274-82.

Philipp, S., Cavalie, A., Freichel, M., Wissenbach, U., Zimmer, S., Trost, C., Marquart, A., Murakami, M., Flockerzi, V. (1996) A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to *Drosophila* TRP and TRPL. *EMBO J.* 15, 6166-71.

Plempner, R.K., Wolf, D.H. (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* 24, 266-70.

Powell, K.S., Latterich, M. (2000) The making and breaking of the endoplasmic reticulum, *Traffic.* 1, 689-94.

Presley, J.F., Cole, N.B., Schroer, T.A., Hirschberg, K., Zaal, K.J., Lippincott-Schwartz, J. (1997) ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature.* 389, 81-5.

Putney J.W. Jr., McKay R.R. (1999) Capacitative calcium entry channels. *Bioessays*, 21, 38-46

Ramanathan, V.K., Hall, Z.W. (1999) Altered glycosylation sites of the delta subunit of the acetylcholine receptor (AChR) reduce alpha delta association and receptor assembly. *J. Biol. Chem.* 274, 20513-20.

Reeves, D.C., Lummis, S.C. (2002) The molecular basis of the structure and function of the 5-HT₃ receptor: a model ligand-gated ion channel (review). *Mol. Membr. Biol.* 19, 11-26.

Riordan, J.R. (1999) Cystic fibrosis as a disease of misprocessing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator glycoprotein. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 1499-504.

Sadler, J.E. Biosynthesis of glycoproteins: formations of o-linked oligosaccharides. In Ginsburg V. and Robbins P.W. (eds.). *Biology of carbohydrates*. vol. 2 Wiley, New York, pp. 199 - 288

Scales, S.J., Pepperkok, R., Kreis, T.E. (1997) Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell.* 90, 1137-48.

Scanlin, T.F., Glick, M.C. (2000) Terminal glycosylation and disease: influence on cancer and cystic fibrosis. *Glycoconj. J.* 17, 617-26.

Schwartz, M.A., Ginsberg, M.H. (2002) Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat. Cell Biol.* 4, 65-8.

Sifers, R.N. (1995) Defective protein folding as a cause of disease. *Nat. Struct. Biol.* 2, 355-7.

Singh, D.G., Lomako, J., Lomako, W.M., Whelan, W.J., Meyer, H.E., Serwe, M., Metzger, J.W. (1995) beta-Glucosylarginine: a new glucose-protein bond in a self-glucosylating protein from sweet corn. *FEBS Lett.* 376, 61-4.

Spiegel, S., Milstien, S. (2007) Functions of the multifaceted family of sphingosine kinases and some close relatives. *J. Biol. Chem.* 282, 2125-9.

Spiro, R.G. (1973) Glycoproteins. *Adv. Protein Chem.* 27, 349-467.

Stephens, D.J., Lin-Marq, N., Pagano, A., Pepperkok, R., Paccaud, J.P. (2000) COPI-coated ER-to-Golgi transport complexes segregate from COPII in close proximity to ER exit sites. *J. Cell Sci.* 113, 2177-85.

Stoffel, W. (1970) Studies on the biosynthesis and degradation of sphingosine bases. *Chem. Phys. Lipids.* 5, 139-58.

Stühmer, W., Ruppersberg, J.P., Schruer, K.H., Sakmann, B., Stocker, B., Giese, K.P., Perschke, A., Baumann, A., Pongs, O. (1989) Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO J.* 8, 3235-44.

Sumikawa, K., Miledi, R. (1989) Assembly and N-glycosylation of all ACh receptor subunits are required for their efficient insertion into plasma membranes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 5, 183-92.

Sun, M., Goldin, E., Stahl, S., Falardeau, J.L., Kennedy, J.C., Acierno, J.S. Jr, Bove, C., Kaneski, C.R., Nagle, J., Bromley, M.C., Colman, M., Schiffmann, R., Slaugenhaupt, S.A. (2000) Mucopolidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2471-8.

Tecott, L., Shtrom, S., Julius, D. (1995) Expression of a serotonin-gated ion channel in embryonic neural and nonneural tissues. *Mol. Cell Neurosci.* 6, 43-55.

Tiruppathi, C., Freichel, M., Vogel, S.M., Paria, B.C., Mehta, D., Flockerzi, V., Malik, A.B. (2002) Impairment of store-operated Ca²⁺ entry in TRPC4(-/-) mice interferes with increase in lung microvascular permeability. *Circ. Res.* 91, 70-6.

Tracey, W.D. Jr, Wilson, R.I., Laurent, G., Benzer, S. (2003) painless, a *Drosophila* gene essential for nociception. *Cell.* 113, 261-73.

Trebak, M., Bird, G.S., McKay, R.R., Birnbaumer, L., Putney, J.W. Jr. (2003) Signaling mechanism for receptor-activated canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channels. *J. Biol. Chem.* 278, 16244-52.

Vannier, B., Zhu, X., Brown, D., Birnbaumer, L. (1998) The membrane topology of human transient receptor potential 3 as inferred from glycosylation-scanning mutagenesis and epitope immunocytochemistry. *J. Biol. Chem.* 273, 8675-9.

Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology.* 3, 97-130.

Varki, A. (1999) Glycosylation changes in cancer, in: A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G Hart, J. Marth (Eds.), *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 537 - 549

Verbert, A. (1995) *Glycoproteins*; Montreuil, J.; Schachter, H., Vliegenhardt, J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 29a, 145 – 152

Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W. (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 1015-68.

Wadsworth, S., Halvorson, M.J., Chang, A.C., Coligan, J.E. (1993) Multiple changes in VLA protein glycosylation, expression, and function occur during mouse T cell ontogeny. *J. Immunol.* 150, 847-57.

Watanabe, I., Jing, Z., Recio-Pintos, E., Thornhill, W.B. (2004) Glycosylation affects the protein stability and cell surface expression of Kv1.4 but Not Kv1.1 potassium channels. A pore region determinant dictates the effect of glycosylation on trafficking. *J. Biol. Chem.* 279, 8879-85.

Wes, P.D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G., Montell, C. (1995) TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92, 9652-6.

Wickner, S., Maurizi, M.R., Gottesman, S. (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*. 286, 1888-93.

Wu, G., D'Agati, V., Cai, Y., Markowitz, G., Park, J.H., Reynolds, D.M., Maeda, Y., Le, T.C., Hou, H. Jr, Kucherlapati, R., Edelmann, W., Somlo, S. (1998) Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. *Cell*. 93, 177-88.

Xu, X.Z., Chien, F., Butler, A., Salkoff, L., Montell, C. (2000) TRPgamma, a drosophila TRP-related subunit, forms a regulated cation channel with TRPL. *Neuron*. 26, 647-57.

Xu, X.Z., Li, H.S., Guggino, W.B., Montell, C. (1997) Coassembly of TRP and TRPL produces a distinct store-operated conductance. *Cell*. 89, 1155-64.

Xu, X.Z., Sternberg, P.W. (2003) A *C. elegans* sperm TRP protein required for sperm-egg interactions during fertilization. *Cell*. 114, 285-97.

Yao, Y., Ferrer-Montiel, A.V., Montal, M., Tsien, R.Y. (1999) Activation of store-operated Ca^{2+} current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell*. 98, 475-85.

Yatomi, Y., Igarashi, Y., Yang, L., Hisano, L., Qi, R., Asazuma, N., Satoh, K., Ozaki, Y., Kume, S. (1997) Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J. Biochem*. 121, 969-73.

Yatomi, Y., Ruan, F., Hakamori, S., Igarashi, Y. (1995) Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets. *Blood*. 86, 193-202.

Yellen, G. (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*. 419, 35-42.

Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E., Birnbaumer, L. (1996) trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry. Cell. 85, 661-71.

Zweifach, A., Lewis, R.S. (1995) Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and -independent mechanisms. J. Biol. Chem. 270, 14445-51.

8. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren in Marburg:

- Herr Prof. Dr. med. R. Arnold
- Herr Prof. Dr. med. T. Bach
- Herr Prof. Dr. med. P. J. Barth
- Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H.D. Basler
- Frau Prof. Dr. med. E. Baum
- Herr Prof. Dr. med. H. Becker
- Herr PD Dr. med. Christiansen
- Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Daut
- Herr Prof. Dr. med. M. Eilers
- Herr Dr. med. von Garrel
- Herr PD Dr. med. Gerdes
- Herr Prof. Dr. phil. A. Geus
- Herr Prof. Dr. med. C. Görg
- Herr Dr. med. K. Görg
- Herr Prof. Dr. med. L. Gotzen
- Herr Prof. Dr. med. P. Griss
- Herr Prof. Dr. med. T. Gudermann
- Herr Prof. Dr. med. R. Happle
- Herr Dr. med. G. Heller
- Herr PD Dr. med. A. Hellinger
- Herr PD Dr. med. L. Hesse
- Herr Prof. Dr. med. R. Hofmann
- Frau Dr. med. A. Holland
- Herr Prof. Dr. rer. nat. H. Jungclas
- Herr Prof. Dr. med. H.F. Kern
- Herr Prof. Dr. med. H.-D. Klenk
- Herr Prof. Dr. med. U. Köhler
- Herr PD Dr. med. R. von Knobloch
- Herr Prof. Dr. med. V. Kretschmer

- Herr Prof. Dr. med. J.-C. Krieg
- Herr Prof. Dr. med. E. Lammel
- Herr Prof. Dr. med. R.E. Lang
- Herr Dr. rer. nat. Mederos y Schnitzler
- Herr Prof. Dr. med. R. Moll
- Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. U. Müller
- Herr Prof. Dr. med. W.H. Örtel
- Herr Prof. Dr. med. Dr. psych. H. Remschmidt
- Herr Prof. Dr. med. H. Renz
- Herr Prof. Dr. rer. nat. K.-H. Röhm
- Prof. Dr. med. M. Rothmund
- Herr Prof. Dr. rer. nat. H. Schäfer
- Herr Prof. Dr. med. S. Schmidt
- Herr Prof. Dr. med. M. Schnabel
- Frau Prof. Dr. med. B. Steiniger
- Herr Prof. Dr. med. G. Suske
- Herr Prof. Dr. med. C. Vogelmeier
- Herr PD Dr. med. H.-W. Vohland
- Herr Prof. Dr. med. Weihe
- Herr Prof. Dr. med. J. A. Werner
- Herr PD Dr. rer. nat. R. Westermann
- Herr Prof. Dr. med. H. J. Wulf

9. Danksagung

Ich möchte zuerst Herrn Prof. Dr. med. Gudermann danken, an dessen Institut für Pharmakologie und Toxikologie ich diese Arbeit durchführen durfte. Dabei hat Herr Prof. Gudermann es verstanden, auch bei uns Medizinstudenten das Interesse an der Grundlagenforschung zu wecken und zu erhalten.

Ganz besonderen Dank gilt meinem Betreuer, Dr. rer. nat. Mederos y Schnitzler, der mit großer Geduld und Aufopferungsbereitschaft mir mit Rat und Tat in allen theoretischen wie praktischen Belangen zur Seite stand und mit dessen Hilfe schließlich diese Arbeit beendet werden konnte. Des Weiteren sei Frau Ursula Storch genannt, die mit großer Hingabe mir durch die Schwierigkeiten der praktischen Versuchsdurchführung half. Herrn Lennart Skrobek sowie Frau Simone Meibers, Frau Janine Wäring und Herrn Andreas Oldewurtel möchte ich für die angenehme Zeit im Labor danken mit reichlich Anregung sowohl für die weitere Umsetzung der praktischen Versuche als auch für die notwendige Erholung vom Laboralltag.

Zuletzt möchte ich allen Angehörigen des Instituts für Physiologie danken, die meine Arbeit mit allen notwendigen Transfektionsmedien sowie cDNA erst möglich gemacht haben.

10. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Einfluß des Glycosylierungsmusters auf die Basalaktivität von hTRPC3 und hTRPC6“ im Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. T. Gudermann mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. T. Gudermann selbst sowie seine Mitarbeiter ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem anderen in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch zur Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Stuttgart, den 20.12.07

Jens Emmel